



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ**

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**STANOVENÍ ORGANICKÝCH KYSELIN V PIVĚ**

DETERMINATION OF ORGANIC ACIDS IN BEER

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Taťána Štáblová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**

**BRNO 2018**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1268/2017  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Studentka: **Taťána Štáblová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie  
Vedoucí práce: **doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název bakalářské práce:

Stanovení organických kyselin v pивě

### Zadání bakalářské práce:

1. vypracování literární rešerše k tématu práce
2. optimalizace metody pro stanovení organických kyselin v pивě pomocí HPLC
3. zpracování naměřených výsledků

### Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Taťána Štáblová  
student(ka)

-----  
doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2018

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tématem této bakalářské práce je stanovení organických kyselin v českých pivech s chráněným zeměpisným označením. V teoretické části jsou popsány hlavní suroviny pro výrobu piva a samotná výroba sladu a piva. Část práce je věnována analytickým metodám použitých při stanovení organických kyselin. Pro stanovení obsahu organických kyselin byly využity metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie a iontové chromatografie. Experimentální část se zabývá přípravou vzorků, kalibračních roztoků a postupem analýzy. Ve výsledcích a diskuzi jsou zpracovány veškeré výsledky, porovnány se zahraničními studiemi a určeny rozdíly v obsahu organických kyselin mezi ležáky a pivy výčepními. Pro analýzu bylo použito pět piv typu ležák a pět výčepních piv.

## **ABSTRACT**

The topic of this bachelor's thesis is determination of organic acids in Czech beers with protected geographical indication. There are described the main components for beer production and the production of malt and beer itself in the theoretical part. Part of this work is dedicated to analytical methods used in determination of organic acids. High-performance liquid chromatography and ion chromatography were used to determine the content of organic acids. The experimental part deals with sample preparation, calibration solutions and procedure of analysis. The obtained results of analyzed substances are summarized, discussed, and compared with results of analyses of foreign papers. Differences in content of organic acids in lager and draught beers were determined. Five lager beers and five draught beers were used for the analysis.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

pivo, organické kyseliny, HPLC, IC

## **KEYWORDS**

beer, organic acids, HPLC, IC

ŠTÁBLOVÁ, T. *Stanovení organických kyselin v pивě*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 47 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D..

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce, panu doc. Ing. Pavlu Divišovi, Ph.D., za odborné vedení, vstřícný přístup a poskytování cenných rad a připomínek v průběhu řešení bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. za pomoc při samotné analýze i při zpracování výsledků.

# OBSAH

1. ÚVOD .....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1. Výroba sladu.....	8
2.1.1. Typy sladů .....	8
2.1.2. Ječmen .....	8
2.1.3. Chemické složení obilky .....	8
2.1.4. Čištění, třídění a skladování ječmene.....	10
2.1.5. Máčení .....	11
2.1.6. Klíčení .....	11
2.1.7. Hvozdění .....	12
2.1.8. Odkličování a pulírování .....	12
2.2. Chmel.....	12
2.2.1. Chemické složení chmele.....	13
2.3. Voda.....	13
2.4. Výroba piva .....	14
2.4.1. Šrotování .....	14
2.4.2. Vystírání .....	14
2.4.3. Rmutování .....	15
2.4.4. Scezování a vyslazování.....	17
2.4.5. Chmelovar .....	17
2.4.6. Chlazení mladiny a odlučování kalů .....	19
2.4.7. Kvašení.....	19
2.4.8. Dokvašování.....	20
2.4.9. Filtrace.....	21
2.4.10. Pasterace piva .....	21
2.4.11. Stáčení piva.....	21
2.5. Chráněné zeměpisné označení České pivo .....	21
2.6. Organické kyseliny .....	22
2.6.1. Kyselina mléčná .....	23
2.6.2. Kyselina octová .....	23
2.6.3. Kyselina citronová.....	24

2.6.4.	Kyselina jablečná .....	24
2.6.5.	Kyselina jantarová.....	24
2.6.6.	Kyselina šťavelová .....	25
2.7.	Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	25
2.7.1.	Součásti kapalinového chromatografu .....	26
2.7.2.	Iontová chromatografie .....	28
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
3.1.	Seznam chemikálií.....	29
3.2.	Seznam laboratorních pomůcek.....	29
3.3.	Přístroje.....	29
3.4.	Příprava kalibračních roztoků na IC .....	30
3.5.	Příprava kalibračních roztoků na HPLC .....	30
3.6.	Kalibrace při použití metody iontové chromatografie.....	30
3.7.	Popis analyzovaných vzorků .....	31
3.8.	Příprava vzorků.....	31
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	32
4.1.	Optimalizace HPLC metody.....	32
4.1.1.	Stanovení organických kyselin metodou IC.....	34
4.2.	Porovnání koncentrací jednotlivých kyselin v pivech o různé stupňovitosti metodou ANOVA .....	41
5.	ZÁVĚR.....	42
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	43
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	47

## 1. ÚVOD

Pivovarství se v České republice řadí mezi významné obory potravinářského průmyslu. Vyrábí se piva světlá, tmavá, výčepní, ležáky a speciály nebo piva se sníženým obsahem alkoholu. Technologie výroby se skládá ze tří hlavních úseků – výroby mladiny, kvašení mladiny a závěrečných úprav piva. Základními surovinami pro výrobu piva jsou slad, chmel, voda a pivovarské kvasinky.

Pivo je kvašený nápoj s nižším obsahem alkoholu obsahující řadu sloučenin např. sacharidy, bílkoviny, vyšší alkoholy, estery, organické kyseliny, hořké chmelové látky, polyfenoly, oxid uhličitý a minerální látky. Pivo je zdrojem vitaminů, především ze skupiny B. Tyto látky se do piva dostávají extrakcí z pivovarských surovin nebo vznikají při kvašení. Jejich správný poměr zaručuje typickou chuť piva.

První část této bakalářské práce se skládá z literární rešerše k technologii výroby sladu a piva. Popsána je hlavně základní výroba sladu plzeňského a mnichovského typu a klasická výroba piva plzeňského typu, dekokční dvourmutový postup rmutování a spodní kvašení.

Experimentální část práce se věnuje stanovení organických kyselin pomocí HPLC a IC ve vybraných druzích piva. Naměřené výsledky jsou zpracovány a porovnány s výsledky autorů, kteří se stanovením organických kyselin zabývali. Cílem práce je optimalizace metody stanovení organických kyselin, jmenovitě citronové, octové, mléčné, jablečné a jantarové pomocí HPLC. Organické kyseliny ovlivňují chuť piva, pH a náchylnost piva k napadení mikroorganismy. Tyto kyseliny vznikají především při kvašení spolu s ethanolem a oxidem uhličitým.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1. Výroba sladu**

Slad je jednou ze tří surovin potřebných pro výrobu piva. Jedná se o naklíčený a usušený ječmen, který vzniká sladováním. Sladování představuje proces řízeného klíčení ječných obilí, při kterém dochází k aktivaci a následné syntéze enzymů, které jsou nezbytné pro výrobu piva. Technologie výroby sladu začíná tříděním ječných zrn, máčením a klíčením. Následuje rozluštění sladu, hvozďení, odkličování a konečné pulírování [1, 2, 16].

#### **2.1.1. Typy sladů**

Běžně jsou vyráběny světlé slady plzeňského typu a slady tmavé mnichovského neboli bavorského typu. Jednotlivé typy se od sebe liší chemickým složením a tím i využitím. Rozdílných vlastností sladů je dosaženo úpravami technologie máčení a klíčení. Těmito modifikacemi se docílí například vyšší aktivity amylolytických enzymů, a hlavně míry degradace vysokomolekulárních látek. U tmavého sladu mnichovského typu tak lze dosáhnout vyššího obsahu bílkovin, výraznějšího aroma a vyšší koncentrace produktů Maillardovy reakce [1, 2, 5, 6].

Plzeňský světlý slad se používá k výrobě světlých piv. Světlé slady mají nízkou hodnotu barvy sladiny a barvy po povaření. Oproti sladům mnichovského typu jsou méně rozluštěné a při hvozďení jsou dotahovány při teplotách kolem 80 °C [1, 2, 5, 6].

Mnichovský slad má naopak vyšší intenzitu barvy a výraznější aroma čehož je dosaženo intenzivnějším rozluštěním a vyšší dotahovací teplotou, která se pohybuje kolem 100 °C. Slad mnichovského typu je používán k výrobě tmavých piv [6].

Mezi další slady patří pšeničný slad ze pšenice seté, pražené karamelové slady s vysokým obsahem sacharidů nebo například diastický slad, který déle klíčí a má vysokou enzymatickou aktivitu [1, 2, 5, 6].

#### **2.1.2. Ječmen**

Ječmen je klíčová surovina pro výrobu sladu. Jedná se o jednoletou, krytosemennou rostlinu. K výrobě sladu se využívá ječmen jarní, nejčastěji se dvěma řadami zrn v klase. Největší předností ječmene je nenáročnost na vláhu a teplotu. Díky ideálním chuťovým vlastnostem, vhodným složením zrna a poměrně nenáročným zpracováním zůstává ječmen jako hlavní sladovaná obilnina, přestože existuje mnoho dalších sladovatelných obilovin. Odrůdy ječmene mají velký vliv na kvalitu sladu a následně i piva [2, 3, 6].

#### **2.1.3. Chemické složení obilky**

Ječmen obsahuje zhruba 85 % sušiny a 15 % vody. Z technologicky nejvýznamnějších látek obsahuje sladovnický ječmen zejména škrob a dusíkaté látky, v menší míře jsou zastoupeny tuky, fosfáty, polyfenoly a minerální látky. Anorganické látky jako zinek a mangan jsou obsaženy zejména v enzymech a koenzymech [2, 3, 16].

##### **2.1.3.1. Sacharidy**

Sacharidy tvoří přibližně 80 % hmotnosti zrna. Nejvíce zastoupený je škrob, jenž tvoří asi 60 % z celkového obsahu sacharidů. Nachází se v malých a velkých škrobových zrnech. Velká škrobová zrna tvoří 90 % hmotnosti škrobu a obsahují méně doprovodných látek než malá



škrobová zrna, a proto jsou lépe přístupná amylolytickým enzymům. Malá škrobová zrna obsahují i neškrobové látky a proteiny [3, 6, 16].

Škrob slouží jako zdroj živin ke klíčení, skládá se z  $\alpha$ -amylosy a amylopektinu. Amylosa je tvořena jednotkami glukosy vázanými  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) glykosidovými vazbami. Amylopektin tvoří větší část molekuly škrobu a je složen z glukosových jednotek vázanými  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) a  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) glykosidickou vazbou.  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) glykosidové vazby umožňují u amylosy tvorbu šroubovice, naopak  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) vazby v amylopektinu ve tvorbě zabraňují [3, 6].

Celulosa tvoří 5 % zrna, technologicky není příliš významná, jelikož se při zpracování nijak nemění. Je obsažena v pluchách, zpevňuje buněčné stěny [3, 6].

Buněčné stěny obsahují  $\beta$ -glukany a pentosany, které negativně ovlivňují výrobu piva.  $\beta$ -glukany a pentosany se řadí mezi hemicelulosity.  $\beta$ -glukany se skládají z glukosových jednotek vázaných  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidovými vazbami. Tvoří zesíťovanou strukturu, která brání filtraci. Dále zvyšují viskozitu sladiny, mladiny a piva. Pentosany neboli arabinoxylany se skládají z xylosových a arabinosových jednotek vázaných  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) vazbou. Tvoří nebiologický zákal piva [3, 6, 15, 16].

#### **2.1.3.2. Fenolické látky**

Fenolické látky se v ječmeni vyskytují ve volné i vázané formě v obalových částech zrna. Největší část volných fenolických látek tvoří flavonoidy. Flavonoidy mohou být barevné (anthokyaniny a anthokyanidiny) a bezbarvé (katechiny). Z vázaných fenolických látek se objevují zejména fenolické kyseliny (syringová, vanilinová a kávová) [3, 4, 6].

Celkové množství těchto látek se pohybuje od 0,1 do 0,6 % sušiny. Fenolické sloučeniny mají antioxidační schopnost, která zvyšuje koloidní stabilitu piva a potlačuje oxidační procesy. Polyfenoly asociují s polypeptidy, vytvořené kaly se odstraňují při chlazení mladiny. Přispívají k plnější chuti piva [3, 4, 6].

#### **2.1.3.3. Dusíkaté látky**

Sloučeniny dusíku tvoří zhruba 10 % hmotnosti zrna a jsou z 97 % tvořeny bílkovinami, zbytek tvoří polypeptidy, dusíkaté báze a aminokyseliny. Některé látky mohou negativně ovlivňovat senzorycké vlastnosti piva nebo tvořit zákaly, jiné jsou však důležité pro množení kvasinek a přispívají k plnější chuti piva [3, 6, 16].

Mezi sladařsky nejdůležitější dusíkaté látky patří enzymy, které jsou aktivovány při klíčení. Oxidoreduktasy se podílejí na metabolismu sacharidů a dusíkatých látek. Ovlivňují obsah polyfenolů, barvu sladiny a stabilitu piva. Superoxiddismutáza přeměňuje volné radikály na peroxid vodíku a vodu. Bez přítomnosti tohoto enzymu by docházelo k peroxidaci lipidů a degradaci polysacharidů [3, 6].

Nežádoucím enzymem je lipoxygenasa, která katalyzuje oxidaci nenasycených mastných kyselin. Reakcí vznikají aldehydy s nežádoucími vůněmi a chutěmi [3, 6].

Hydrolázy katalyzují štěpení vazeb za pomoci vody. Důležitou hydrolázou je  $\beta$ -glukanáza, která štěpí  $\beta$ -glukany na nízkomolekulární  $\beta$ -glukany a cellobiosu při teplotách do 60 °C.

Enzym se tvoří až při klíčení, jeho aktivita roste v průběhu sladování.  $\beta$ -glukany jsou nežádoucí, protože zvyšují viskozitu sladiny a snižují filtrovatelnost piva [3, 6].

Dalšími důležitými hydrolázami jsou amylázy, které štěpí škrob a tím zvyšují obsah zkvasitelných sacharidů.  $\beta$ -amylasa odštěpuje jednotky maltos od neredukujícího konce řetězce škrobu. Před dosažením větvení se zastaví a odštěpí se dextrin. Při klíčení vzniká  $\alpha$ -amyláza odštěpující  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidické vazby. Štěpením mohou vznikat oligosacharidy, maltotriosa, maltosa i glukosa. Společným účinkem obou enzymů vzniká glukóza a maltóza [3, 6].

Proteolytické enzymy katalyzují štěpní bílkovin. Exopeptidasy štěpí peptidový řetězec od konce, endopeptidázy štěpí bílkoviny uprostřed řetězců. Endopeptidázy jsou důležité pro dokonalé rozluštění sladu. Při vysokém obsahu bílkovin se pivo stává méně koloidně stabilní a nemá pěnu. Bílkoviny zhoršují filtrovatelnost, mění barvu sladiny a v hotovém pivu tvoří zákal. Z technologického hlediska jsou proto hydrolázy jedny z nejdůležitějších enzymů [3, 6].

#### **2.1.4. Čištění, třídění a skladování ječmene**

Pro výrobu sladu je důležitý nákup ječných zrn dostatečné kvality a jejich následné čištění. Účelem těchto procesů je příprava zrna na uskladnění bez prachu a cizích částic [3, 7, 8].

Při příjmu ječmene se kontroluje obsah vody, bílkovin, nečistot a velikost zrn. Následuje předčištění ječmene, kde se ječmen prosévá přes hrubé síto a profukuje proudem vzduchu. Po odstranění listů, kamenů a hlíny obilky procházejí přes jemnější síta, kde se oddělí další hrubé nečistoty a příměsi. Zrna jiných rostlin se odstraňují na triéru [3, 7, 8].

Čistá zrna jsou následně přetříděna podle velikosti, jelikož různá velikost obilky znamená odlišnou rychlost příjmu vody při máčení. Ječné obilky se dělí na dvě třídy, zrna nad 2,5 mm a zrna 2,2–2,5 mm. Zrna pod 2,2 mm se nazývají propad a jsou použita jako krmivo [3].

Vytříděný ječmen je přesunut do větraných sil podle odrůdy, obsahu vody, obsahu bílkovin a jiných kritérií. V silech se kontroluje teplota a vlhkost, aby nedocházelo k plesnivění nebo nežádoucím biochemickým reakcím. Obsah vody v zrnech je úměrný vlhkosti vzduchu, ideální vláhota zrn je 12 %, čehož je dosaženo aktivním větráním. Během skladování by nemělo dojít ke kondenzaci vody na povrchu obilek, aby se nezvýšila pravděpodobnost napadení plísněmi a jinými organismy. Během skladování nesmí dojít k napadení škůdci nebo mikroorganismy [3, 7, 8].

Sila jsou většinou železobetonová, opatřená tlakovým nebo sacím větráním. Přístup kyslíku je velmi důležitý pro aerobní dýchání obilek. Při aerobním dýchání dochází k odbourávání škrobu za vzniku oxidu uhličitého, vody a energie. Při anaerobním dýchání však vzniká ethanol, který narušuje nebo dokonce usmrcuje klíček. Kvašením se také získává méně energie, tudíž ztráta škrobu je mnohem vyšší než u aerobních procesů [3, 7, 8].

Při skladování jsou obilky ve stádiu dormance – životní projevy jsou utlumeny, ne však zastaveny. Inhibitory klíčení – dorminy způsobují špatnou klíčivost čerstvě sklizeného ječmene, které zanikají až postupnou oxidací. Cílem skladování je proto získat obilky s nízkou koncentrací inhibitorů schopných jednotně vyklíčit [3, 7, 8].

### **2.1.5. Máčení**

Máčení je zahajovací proces výroby sladu. V tomto procesu obilka absorbuje vodu, potřebnou ke klíčení a zvětšuje svůj objem o jednu třetinu. Cílem je zvýšení obsahu vody v zrně z 15 % na 42–48 % hmotnosti zrna. Probíhá aerobní respirace, produkce oxidu uhličitého a tepla [3, 6].

Máčení probíhá v náduvnících, kovových nádobách s kónickým dnem, opatřených systémy pro odvod oxidu uhličitého a přívod tlakového vzduchu. Do náduvníku se načerpá voda a do ní se spustí ječmen ze zásobníku. Většina máčiren je opatřena zařízením na probublávání ječmene tlakovým vzduchem. Při použití tlakového vzduchu se zvýší pracovní síla a k zrnům se rovnoměrně dostává voda. Nedochází k anaerobním procesům, jelikož je přístup kyslíku dostatečný [3, 6].

Máčení probíhá ve více etapách. První máčecí voda obsahující nejvíce nečistot je brzy vypuštěna. Následuje vzdušná přestávka, aby se zrno provzdušnilo. Příjem vody je ovlivněn hlavně teplotou vody a velikostí zrna. Čím je zrno větší, tím pomaleji vodu přijímá. Se zvyšujícím se obsahem vody začíná obilka více dýchat.  $\text{CO}_2$  se musí odsávat, jinak by docházelo ke kvašení. Vyprodukovaný ethanol by byl pro embryo toxický. Vzdušné přestávky a namáčení se několikrát opakují, dokud není dosažen požadovaný stupeň domočení [3, 6].

Při máčení dochází k dodatečnému čištění zrn – vyplavuje se prach a úlomky obalu zrna. Do vody se vyluhují některé bílkoviny a hořké látky, které způsobují zákal piva [6, 7].

### **2.1.6. Klíčení**

Klíčení je proces, při kterém se začínají vyvíjet orgány kořínku a klíčku. Cílem klíčení je aktivace a syntéza enzymů a také rozluštění (přeměna vysokomolekulárních látek na jejich štěpné produkty) zrna. Vedení hromad je řízené klíčení ječmene navozené uměle vytvořenými podmínkami přirozeného klíčení. Klíčení probíhá při teplotách 14–20 °C, za vysoké vlhkosti vzduchu po dobu čtyř až pěti dní [3, 7, 8].

Ječmen začíná pomalu klíčit při 38 % obsahu vody. Pokud je obsah vody vyšší než 40 % dochází k rozpuštění a rozluštění endospermu a aktivaci enzymů. Enzymy katalyzují štěpení rezervních polysacharidů, vznikají dextriny a nízkomolekulární cukry. Cukry jsou využity k buněčnému dýchání a růstu orgánů. Dochází ke sladovacím ztrátám, zhruba 4–8 %. Při klíčení je potřeba udržovat určitou koncentraci kyslíku, neboť by při jeho nedostatku docházelo k alkoholovému kvašení a ztráty by byly mnohem větší [3, 7, 8].

Nejdůležitější funkcí klíčení je tvorba amylolytických enzymů, které hydrolyzují škrob způsobem popsaným v odstavci 2.1.3.1. Průběh těchto katalytických reakcí je ovlivněn teplotou hromady, přístupem kyslíku a stupněm domočení. Čím vyšší je obsah vody v zrně, tím rychlejší je transport enzymů a dalších látek, nadbytek vody však způsobuje vyšší sladovací ztráty [3, 6, 8].

Aktivují se také cytolytické enzymy, které štěpí hemicelulózu a celulózu. Rozštěpením buněčných stěn se zpřístupňují škrobová zrna a bílkoviny uzavřené v endospermu. Tyto enzymy způsobují rozluštění sladu, zrno křehne a měkne. Neúplné rozluštění způsobuje problémy v dalších technologických krocích. Nerozluštěný slad prodlužuje dobu zcukření a scezování, ovlivňuje kvašení a snižuje celkový výtěžek [3, 6].

Fosfatasy uvolňují z fyтину fosforečnany, které se zúčastňují kyselých reakcí a snižují pH, potřebné pro funkci ostatních enzymů. Ke kyselé reakci přispívají aminokyseliny a organické kyseliny [3, 7, 8].

Při růstu kořínků a klíčků se nevratně spotřebovávají produkty štěpení škrobu, které mohly být použity jako zdroj extraktu při přípravě piva, proto je důležité klíčení včas zastavit snížením obsahu vody. Většinou se klíčení zastavuje, pokud je délka střelky od dvou třetin do tří čtvrtin délky zrna. U tmavých sladů se střelka nechává dorůst téměř k celé délce zrna a dochází k větším ztrátám. Konečným produktem je zelený slad [3, 6, 7].

#### **2.1.7. Hvozdnění**

Při hvozdnění se snižuje obsah vody v zrně, zastavují se biologické procesy a redukuje se enzymatická aktivita. Vznikají barevné a aromatické látky charakteristické pro daný druh sladu a piva. Výsledný slad je připraven ke skladování nebo šrotování v pivovaru [3, 6].

Klíčení ustává, pokud je obsah vody nižší než 25 %, rozluštění a enzymatická aktivita se zastavuje až při 10 %. Tvorba barevných a aromatických melanoidinů začíná při teplotě 60 °C v zrnech s obsahem vody menším než 10 %. Dusíkaté melanoidiny vznikají Maillardovou reakcí a mají redoxní schopnosti [3, 6].

Melanoidiny vznikají reakcí cukrů se štěpnými produkty bílkovin. Jednou z dalších možností je oxidativní reakce redukonů a produktů štěpení bílkovin. Termické melanoidiny vznikají termickým štěpením proteinů a heterocyklů. Melaniny vznikají oxidací polyfenolů a redukonů. Karamelizací cukernatých složek působením vysoké teploty vznikají bezdusíkaté aromatické látky [3, 6].

Množství těchto látek ovlivňuje charakter sladu. Slady plzeňského typu se hvozdní kratší dobu než slady bavorského typu, u kterých delší dobu působí enzymy a vytváří tak více štěpných produktů (sacharidů a aminokyselin). Konečná dotahovací teplota je u sladu bavorského typu 105 °C, kdežto u plzeňského typu 80–85 °C. Ve vyšších teplotách se zvyšuje produkce melanoidinů, výtěžek je však nižší, jelikož se snižuje obsah škrobu delším hvozdním [3, 6].

#### **2.1.8. Odkličování a pulírování**

Odkličování je poslední fází výroby sladu. Ochlazený slad je zbaven klíčků a kořínků na odkličovačkách. Oddělené klíčky, sladový květ, se používá jako krmivo. Před expedicí se slad čistí na leštičkách, kde je slad vyleštěn a zároveň vyčištěn od prachu [3, 6].

### **2.2. Chmel**

Chmel patří do základních surovin potřebných pro výrobu piva. Dodává pivu hořkost a aroma zejména díky  $\alpha$ -hořkým kyselinám. Pro výrobu piva se používá poddruh chmele otáčivého, chmel evropský. Podle pigmentace hlávek se dělí na červeňáky obsahující anthokyany a zeleňáky bez červených barviv. Z rostliny je z pivovarského hlediska nejdůležitější hlávka, která se skládá z krycích a pravých listenů, stopky a věténka. K výrobě piva se používají hlávky pouze ze samičích rostlin, které jsou náročné na pěstování [6].

Ke konzervaci chmele se využívá sušení. Sušení probíhá při teplotách 55–95 °C, podle doby vystavení chmele dané teplotě. Z původních 70–80 % se sušením dosáhne obsahu vody asi

10 %. Při vyšší vlhkosti by hlávka mohla být napadena mikroorganismy. Usušený chmel se následně lisuje a balí. Chmel by měl být skladován při nižších teplotách, ideálně bez přístupu vzduchu, aby nedocházelo k oxidaci pryskyřic a silic [6].

### **2.2.1. Chemické složení chmele**

Mezi technologicky nejdůležitější látky chmele patří polyfenoly, silice a chmelové pryskyřice.

Polyfenoly jsou antioxidanty a brání před oxidací chmelových pryskyřic. Reagují s dusíkatými látkami a podporují odstraňování kalů při výrobě piva. Ve chmelu jsou přítomny hlavně hydroxybenzoové kyseliny, flavonoly, flavanoly a proanthokyanidiny. Mezi flavonoly se řadí kemferol, kvarcetin a jejich glykosidy, mezi významné katechiny patří katechin, epikatechin a gallokatechin. Z bezbarvých leukoanthokyanidinů se při nízkém pH tvoří barevné anthokyanidiny, např. kyanidin. Z polyfenolických látek jsou dále obsaženy různé kyseliny. Nejdůležitější je kyselina chlorogenová a její deriváty. Při jejich oxidaci na chinony dochází k hnědnutí piva [6].

Chmelové silice jsou látky různého složení, rozdělené do tří skupin. Uhlovodíková frakce silic obsahuje zejména alifatické uhlovodíky, monoterpeny a seskviterpeny, např. myrcen resp.  $\alpha$ -humulen. Do kyslíkaté frakce se řadí terpenové alkoholy a karbonylové sloučeniny. Jelikož se jedná o látky rozpustné ve vodě, je jejich obsah v pivě značný. Důsledkem je výrazné aroma. Nejvíce obsaženy jsou linalool, geraniol, humulol a humulenol. Poslední frakcí jsou sirné sloučeniny, které negativně ovlivňují aroma a chuť piva [6].

Chmelové pryskyřice jsou původci hořké chuti a jsou nejdůležitější složkou chmele. Jsou tvořeny různými sloučeninami, největší účinnost mají však  $\alpha$ -hořké a  $\beta$ -hořké kyseliny, patřící do skupiny měkkých chmelových pryskyřic. Méně významné jsou nespecifické měkké pryskyřice a tvrdé pryskyřice [6].

$\alpha$ -hořké kyseliny se skládají hlavně z humulonů, kohumulonů a adhumulonů. Množství těchto látek závisí na odrůdě chmelu, podmínkách pěstování a skladování.  $\alpha$ -hořké kyseliny snadno izomerují na iso- $\alpha$ -hořké kyseliny při vaření sladiny [6].

$\beta$ -hořké kyseliny jsou směsí lupulonů, kolupulonů a adlupulonů. Jsou více reaktivní a méně rozpustné než  $\alpha$ -hořké kyseliny a mají nahořklou chuť. Izomerací vznikají hulupony, které mají větší hořkost než původní  $\beta$ -hořké kyseliny [6].

### **2.3. Voda**

Voda je důležitou surovinou v potravinářském průmyslu. V pivovarství je voda dělena do tří skupin, a to sice varní vodu použitou na výrobu piva, mycí vodu a provozní vodu, což je voda použitá při chlazení nebo pro přípravu vodní páry [6].

Tvrdost vody je dána koncentrací hořečnatých a vápenatých iontů. Rozlišuje se na tvrdost stálou nekarbonátovou a přechodnou karbonátovou. Přechodná tvrdost je tvořena hydrogenuhlíčitany, které se rozkládají varem, na rozdíl od vápenatých a hořečnatých solí, které jsou stálé. Při chmelovaru dochází k rozpadu hydrogenuhlíčitanů a vzniku oxidu uhličitého. Hydrogenuhlíčitanové a uhličitánové ionty zvyšují pH a negativně působí na varní proces.

Naopak stále ionty mohou pozitivně ovlivnit pH reakcemi s fosforečnany, ve kterých vznikají sírany. Docílí se tak zvýšení acidity rmutů, sladiny a mladiny [3, 6].

Voda pro výrobu plzeňských piv by měla být měkká, s nízkým obsahem anorganických látek. Ve vodě pro tmavá piva vyšší obsah uhličitánů a vápníku nevadí [6].

## **2.4. Výroba piva**

Samotná výroba piva se skládá ze tří výrobních úseků – výroby mladiny ze sladu, vody a chmele, kvašení mladiny a dokvašování mladého piva, a nakonec závěrečných úprav piva a jeho stáčení [9].

### **2.4.1. Šrotování**

Šrotování je proces, ve kterém se mechanicky rozeleme vyčištěný slad na mlecích stolicích – šrotovnicích. Šrot ovlivňuje zejména rmutování, kde je žádoucí zisk co nejvíce extrahovatelných látek ze sladu. Šrotování může probíhat za sucha nebo za mokra. Mletím sladu získáváme hrubou a jemnou krupici, mouku a vymleté pluchy. Po rozemletí se ve šrotu nevyskytují žádná celá zrna [3, 6].

Šrotování probíhá ve šrotovnicích. Nejpoužívanější jsou šrotovníky pro suché šrotování složené ze dvou až šesti válců. Před šrotováním může být slad upraven kondicionováním horkou párou nebo rozstříkem vody. Při kondicionování párou dochází ke kondenzaci vody na povrchu zrn a ke zvýšení vlhkosti zrna o 1–2 % vody. Při kondicionování rozstříkem vody se na slad rozpráší voda o teplotě kolem 35 °C, slad vstupuje do výdržníku, kde se přebytečná voda adsorbuje. Dochází k nárůstu vlhkosti o 1,3–1,5 %. Účelem kondicionování je zvýšení odolnosti pluch vůči rozemílání a zvýšení jejich pružnosti. Dochází ke zvýšení varního výtěžku, jelikož se zvýší objem pluch a sníží podíl hrubé krupice při mletí. Poškození pluch by negativně ovlivnilo chuť piva vyluhováním nežádoucích látek. Vyšší obsah hrubé krupice se hůře rozpouští a pomalu zcukřuje, tím dochází k horšímu prokvašení a ztrátě výtěžku [3, 6].

Při šrotování za mokra se zrno máčí rozstříkem vody v zásobníku sladu a cirkuluje 15 až 20 min. Obsah vody vzrůstá až na 30 %. Tento typ šrotování je nevýhodný, poněvadž dochází k nerovnoměrnému příjmu vody, vznikají přemočená zrna, které se hůře zpracovávají [3, 6].

Nerozemleté pluchy jsou důležité pro tvorbu filtrační přepážky při scezování mláta. Čím větší je podíl celistvých pluch, tím rychleji filtrace proběhne. Rozemleté pluchy uvolňují více látek způsobujících nežádoucí hořkost a změnu barvy než pluchy v celku [3, 6].

Cílový šrot obsahuje vymleté, nepoškozené pluchy, nízký obsah hrubé krupice a vysoký obsah jemné krupičky. Při dobře rozemletém endospermu, který při mletí přechází na jemnou krupici, se zvyšuje výtěžek. Špičky zrna, které se nerozluštily tvoří hrubou krupici [3, 6].

### **2.4.2. Vystírání**

Vystírání je proces smíchání varní vody se sladovým šrotem. Děj probíhá v měděných nebo nerez ocelových vystíracích nádobách. Cílem je převedení co nejvíce rozpustných látek ze sladu do roztoku. Množství extrahovaných látek ovlivňuje další procesy výroby mladiny i celkovou chuť a kvalitu piva [3, 6].

Teplé vystírání začíná smísením rozemletého sladu a hlavního nálevu, který je rozdělen na dvě části. Nejprve se přidá část o teplotě 35 až 38 °C, poté se přimíchá druhá polovina jako horká voda o teplotě 80 °C. Tento proces se nazývá zapařování a docílí se tak změknutí sladových zrn a rozpuštění části ve vodě rozpustných látek. Výsledná směs má okolo 50 °C a tvoří vhodné podmínky pro činnost proteolytických a cytolytických enzymů. Enzymy rozštěpí obalové části škrobových zrn a činí je tak přístupnějšími pro působení amylolytických enzymů. Dalším krokem je přidavek následného nálevu, pomocí něhož se směs naředí na požadovanou koncentraci mladiny [3, 6].

Mimo teplé vystírání, které je nejčastější při výrobě českých piv, existuje i studené vystírání s teplotou vody pod 20 °C a horké vystírání s teplotou od 50 do 62 °C [3, 6].

#### **2.4.3. Rmutování**

Při rmutování se extrahují látky sladu do roztoku a probíhá enzymatické štěpení škrobu a proteinů. Při rmutování se vystírka postupně ohřívá na teploty, které odpovídají teplotnímu optimu daného amylolytického, proteolytického nebo kyselinotvorného enzymu. Výsledkem je sladina s požadovanou extrahovanou skladbou a mláto [3, 6].

##### **2.4.3.1. Štěpení fosforečnanů**

Kyselinotvorná teplota 35 až 38 °C podporuje aktivitu fosfatáz a rozpouštění látek extraktu. Fosfatázy uvolňují z organických látek, jako je například fytin, kyselinu fosforečnou, která disociuje na fosfát a vodíkový iont a tím snižuje pH. pH je také sníženo díky kyselině mléčné, která se vytváří při výrobě sladu za nedostatečného přístupu kyslíku. Při kyselinotvorné teplotě začínají působit enzymy lipasy, které štěpí v rozmezí 35–50 °C lipidy za vzniku esterů glycerolu [3, 6].

##### **2.4.3.2. Štěpení bílkovin**

Zapařováním se docílí peptonizační teploty 50–55 °C. Zvýší se aktivita proteáz, podporuje se však také štěpení polysacharidů ( $\beta$ -glukanů) a fosforečnanů. Sladina obsahuje přímo rozpustné albuminy, některé globuliny a štěpné produkty bílkovin. Mezi nerozpustné bílkoviny sladiny se řadí gluteliny a prolaminy, které zůstávají v mlátě. Endopeptidasy štěpí proteiny a polypeptidy uvnitř řetězců a zvyšují tak podíl rozpuštěného dusíku. Exopeptidasy odštěpují aminokyseliny z konců řetězců dusíkatých sloučenin. Vysokomolekulární sloučeniny dusíku zvyšují plnost chuti a pěnivost, ale zhoršují koloidní stabilitu piva [3, 6].

##### **2.4.3.3. Štěpení polysacharidů**

Nižší cukrotvorná teplota 60–65 °C představuje teplotní optimum pro  $\beta$ -amylázu, která štěpí amylosu z neredukujícího konce řetězce za vzniku maltosových jednotek. Enzym se inaktivuje při teplotě vyšší než 60 °C a je citlivý na přítomnost kovových iontů [3, 6].

Vyšší cukrotvorná teplota 70–75 °C aktivuje  $\alpha$ -amylázu, dochází ke zcukření škrobu. Tento endoenzym štěpí  $\alpha$ -(1→4) glykosidické vazby nespecificky uprostřed řetězců amylosy za vzniku oligosacharidů. Amylopektin je štěpen na dextriny. Působením enzymu se snižuje viskozita rmutu, nad 80 °C se enzym inaktivuje [3, 6].

Celkově lze tedy štěpení škrobu rozdělit do tří stupňů. Bobtnání a mazovatění je děj, který začíná při teplotách nad 50 °C. Škrobová zrna postupně bobtnají a praskají, amylopektin tvoří

viskózní škrobový maz a amylosa se rozpouští na koloidní roztok. Škrobový maz je štěpen amylolytickými enzymy na maltosu a dextriny. Následuje ztekucení škrobu, kdy se postupně zkracuje řetězec amylosy a amylopektinu. Zcukření je způsobeno  $\beta$ -amylázou, která štěpí vzniklé produkty štěpení amylosy a amylopektinu od neredukujících konců za tvorby maltosy. Uplatňuje se také hraniční dextrináza, která štěpí  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) glykosidické vazby. Úplné zcukření je pak charakteristické obsahem pouze štěpných produktů škrobu [3, 6].

Při rmutování se štěpí i neškrobové polysacharidy,  $\beta$ -glukany a pentosany.  $\beta$ -glukany jsou tvořeny řetězci glukozových jednotek vázanými  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) vazbami.  $\beta$ -glukany se dobře extrahují z více pomletých šrotů a při vyslazování horkou vodou (55–70 °C). Uvolňování  $\beta$ -glukanů do roztoku podporují  $\beta$ -glukansolubilasy. Štěpení  $\beta$ -glukanů zajišťují enzymy endo- $\beta$ -1,4-glukanasa a endo- $\beta$ -1,3-glukanasa. Pentosany jsou štěpeny xylanasou a arabinosidasou za vzniku xylanových řetězců, xylobiosy, respektive oligosacharidů. Gumovité látky zvyšující viskozitu jsou štěpeny  $\beta$ -glukanasami na glukandextriny, při čemž dochází ke snížení viskozity [3, 6, 16].

#### **2.4.3.4. *Reakce polyfenolických látek***

Během rmutování dochází k uvolňování rozpustných polyfenolů, jejich oxidaci a polymeraci. Míra přechodu do roztoku závisí na jemnosti rozemletí sladu a teplotě rmutování. Peroxidas a polyfenoloxidas zapříčiňují pokles obsahu anthokyanogenů a tanoidů, a tím mění redukční sílu mladiny. Polymeraci se snižuje redukční aktivita polyfenolů, jelikož se snižuje jejich celkový podíl. Polymery tvoří komplexy s proteiny a vytváří kaly. Vysokomolekulární polyfenoly zvyšují barvu a zhoršují chuť piva [3, 6, 19, 20].

#### **2.4.3.5. *Technologie rmutování***

Rmutování probíhá ve vyhřívaných nádobách z mědi nebo nerez oceli. Postup procesu je dvojitý, infuzní a dekokční. Jednoduchý infuzní způsob představuje postupné ohřívání rmutu bez povaření nebo mechanických zásahů. Při použití tohoto postupu je získán rmut o nižší senzorické kvalitě a dochází ke ztrátám výtěžku. Při dekokčním způsobu je část rmutu povařena a znovu vrácena do původní směsi za zvýšení její teploty [3, 6].

Existují dekokční postupy jednorumtové, dvourumtové a třírumtové, nejčastěji se používá dvourumtový způsob. Dvourumtový postup začíná se zhruba třetinou vystírky o teplotě kolem 37 °C, která je postupně ohřáta na peptonizační (50–55 °C), nižší (62–65 °C) a vyšší (70–75 °C) cukrotrvornou teplotu a následně povařena. Povařená třetina je poté vrácena k části vystírky, u které se tímto procesem zvýší teplota na nižší cukrotrvornou teplotu. Druhý dílčí rmut se ohřeje na vyšší cukrotrvornou teplotu a po časové prodlevě se povaří. Vrácením druhého dílčího rmutu zpět do vystírací nádoby se docílí zvýšení teploty celého díla na 75–78 °C, což odpovídá odrmutovací teplotě, při které dochází k denaturaci proteinů [3, 6].

Finální odrmutovací teplotou 76–78 °C se zastavují enzymatické reakce denurací většiny enzymů. Přesná teplota je volena tak, aby zbytek  $\alpha$ -amylasy stačil k docukření zbytků škrobu uvolněných z vyslazování mláta [3, 6].



#### **2.4.4. Scezování a vyslazování**

Hustou suspenzi mláta ve vodném roztoku extrahovaných látek získanou při rmutování je potřeba rozdělit scezováním. Scezování je filtrace, ve které je filtrační vrstvou samotné mláto. V první fázi se získává předek, poté se vyslazováním (promýváním mláta horkou vodou) získávají výstřelky. Scezování je ovlivněno kvalitou sladu, složením šrotu, mírou degradace vysokomolekulárních látek a teplotou [3, 6].

Použitím vysokých teplot kolem 100 °C se extrakt vyslazuje nejrychleji, protože klesá viskozita roztoku. Při takto vysokých teplotách se ale inaktivuje  $\alpha$ -amylasa, proto se využívají teploty kolem 76 °C, kdy je amylasa stále aktivní a zároveň nedochází k velkým ztrátám extraktu v mlátě [3, 6].

Scezování sladiny probíhá ve scezovacích kádích. Na dně kádě jsou otvory napojené na potrubí, které vede do scezovacích kohoutů, ze kterých stéká sladina. Scezovací kád' je dále složena z kypřidla se soustavou nožů, kropidla a jalového dna, které zadržuje mláto [3, 6].

Scezování začíná přečerpáním rmutu do scezovací kádě. Proces by měl probíhat co nejrychleji, za minimálního provzdušnění rmutu. Po přečerpání se nechá rmut odpočinout. Při odpočinku probíhá sedimentace pluch a postupně se vytváří filtrační vrstva. Na povrchu rmutu tvoří kaly koagulované bílkoviny. Střední část vrstvy je tvořena jemnějšími částmi pluch, částí endospermu a aleuronové vrstvy nebo rozdrcené střelky. Sedimentace probíhá rychleji při vyšších teplotách a při nízké viskozitě [3, 6].

Dalším krokem je podráždění, při kterém se postupně otevírají a zavírají scezovací kohouty. Tím dochází ke strhnutí kalových částic u dna. Získaný kalný roztok se čerpá zpět do kádě. Následuje samotné scezování, kdy se otevřou kohouty a vytéká sladina – předek. Rychlost stékání závisí na hustotě a viskozitě, teplotě a obsahu  $\beta$ -glukanů [3, 6].

Když hladina sladiny v scezovací kádi klesne tak, že lze vidět povrch mláta, přečerpá se k mlátu voda o teplotě 75 °C. Kohouty jsou zavřeny. Teplota se následně zvýší na 78 °C, stále probíhá štěpení škrobu  $\alpha$ -amylasou. Scezovací kohouty se otevřou a vytékají z nich výstřelky [3,6].

Ve scezovací nádobě zůstává mláto a voda. Mláto se používá do krmných směsí pro dobytek. Získaná sladina pokračuje do varných nádob, kde se vaří s chmelem [3, 6].

#### **2.4.5. Chmelovar**

V průběhu chmelovaru se sladina vaří s chmelem po dobu 90–120 minut. Hlavním cílem je koagulace dusíkatých látek a izomerace hořkých látek chmele. Dochází k odpaření přebytečné vody a tím dosažení obsahu extraktu mladiny odpovídající typu určitého piva. Odpařuje se řada těkavých látek např. chmelové silice, dimethylsulfid nebo karbonylové sloučeniny [3, 6].

Dále se inaktivují enzymy, steriluje mladina a inhibují mikroorganismy. Vytváří se produkty Maillardovy reakce a redukující látky. Redukující látky váží kyslík a chrání jiné látky před oxidací, navíc zvyšují stabilitu piva. Mezi další děje patří oxidační reakce polyfenolů a lipidů [3, 6].

#### **2.4.5.1. Koagulace bílkovin**

Koagulace proteinů je ovlivněna teplotou, pH, složením mladiny a tlakem. Rozpuštěné sloučeniny zhoršují filtraci piva a vyvábí zákal. Koagulace nastává v izoelektrickém bodě, který odpovídá hodnotě pH 5,2. Při záhřevu dochází k rozštěpení vodíkových a disulfidových vazeb proteinů. Tím dochází k agregaci nebo reakci s jinými látkami a následného vyloučení z roztoku [3, 6].

#### **2.4.5.2. Tvorba melanoidinů**

Reakcí aminokyselin a redukujících sacharidů vznikají hnědé melanoidiny. Tvorbou melanoidinů klesá pH, což podporuje koagulaci bílkovin. Aminokyseliny dále reagují s běžnými cukry a  $\alpha$ -dikarbonylovými sloučeninami za tvorby aldehydů, které vytvářejí heterocyklické sloučeniny způsobující starou chuť piva. Vysoká koncentrace aminokyselin v mladině je proto nežádoucí [3, 6].

#### **2.4.5.3. Reakce složek chmele**

Během chmelovaru dochází k izomeraci  $\alpha$ -hořkých kyselin na iso- $\alpha$ -hořké kyseliny. Množství iso- $\alpha$ -hořkých kyselin jde zvýšit vyšší dávkou  $\alpha$ -hořkých kyselin nebo optimální dobou a teplotou chmelovaru. Většího výtěžku se také dosahuje použitím staršího mletého chmele nebo chmelových extraktů. Rozpustnost hořkých látek je vyšší při vyšším pH, avšak s poklesem pH se uvolňují látky s jemnější hořkou chutí. S vyšší teplotou se zvyšuje rozpustnost a množství vznikajících izomerů. Isohumulony a  $\beta$ -hořké kyseliny se adsorbují na hrubé kaly nebo vypadnou z roztoku při snížení pH. Hořkost piva je tedy určena zbývajícím podílem isohumulonů a  $\beta$ -měkkými pryskyřicemi [3, 6].

Na aroma piva se podílejí chmelové silice, zejména myrcen a linalool. Nejdříve probíhá uvolnění silic do mladiny a jejich oxidace, poté zbylé neoxidované silice vytěkají [3, 6].

Polyfenoly chmelu jsou rozpustné a přecházejí do mladiny. Skládají se hlavně z kyseliny gallové, kávové a jejich glykosidů. Polyfenoly podporují plnost chuti a její stabilitu. Polymery a oxidační produkty polyfenolů zvyšují barvu mladiny [3, 6].

#### **2.4.5.4. Dimethylsulfid**

Dimethylsulfid se dostává do varního procesu ze sladu, kde se vytvořil při klíčení jeho prekurzor S-methyl-methionin. Pivo kvůli dimethylsulfidu získává nepříjemnou zeleninovou chuť. Dimethylsulfid je těkavá látka, která se odstraní při intenzivním a dostatečně dlouhém varu [3, 6].

#### **2.4.5.5. Technologie chmelovaru**

Chmelovar probíhá ve varních nádobách z nerez oceli nebo mědi, které lze vytápět horkou vodou nebo párou. Var se udržuje při teplotě 100 °C po dobu zhruba 90 minut. Během této doby se odpaří přibližně 8–10 % vody. Vaření probíhá za atmosférického tlaku, lze však použít vysokotlaké a nízkotlaké postupy [3, 6].

Způsob dávkování chmelových výrobků závisí na jejich kvalitě a druhu připravovaného piva. Chmelení se provádí ve více dávkách. Chmel s vysokým obsahem  $\alpha$ -hořkých kyselin potřebuje delší dobu varu, aby se odstranily senzoricky nežádoucí látky, proto se přidává jako první. Jemné a kvalitní aromatické chmely se přidávají ke konci chmelovaru. Silice při chmelovaru

vytěkají, proto je jejich koncentrace dána až poslední dávkou chmele. Celkově se z chmele využije v technologii procesu jen asi 30 % senzoricky aktivních látek [3, 6].

#### **2.4.6. Chlazení mladiny a odlučování kalů**

Mladina se chladí na zákvasnou teplotu, provzdušní se a vyloučí se z ní hrubé a jemné kaly. Chladí se z teploty okolo 100 °C na teplotu kolem 5 °C [3, 6].

V průběhu chlazení se nejdříve oddělují hrubé kaly při vyšších teplotách, následuje oddělení jemných kalů při teplotách nižších než 60 °C. Množství kalů závisí na použitých surovinách, koncentraci mladiny, chmelení a době varu. Čím vyšší je obsah dusíkatých látek, tím větší je množství hrubých kalů. Stejná situace je i při nízkém pH. Hrubé kaly obecně obsahují nejen dusíkaté látky, ale i hořké chmelové látky, cukry, minerální látky a tuky [3, 6].

Pro separaci hrubých kalů se využívá sedimentace, odstředování nebo filtrace. Sedimentace se dříve prováděla na chladicím stoku, což je plochá železná mísa s mírně nakloněným dnem. Modernější způsob je sedimentace v usazovací kádi, nejčastěji se však používá vířivá kád'. Vířivá kád' je uzavřená válcová nádoba, do které tangenciálně přitéká mladina. Při čerpání vznikají odstředivé síly způsobující vznik víru. Částice kalu jsou strhávány do středu kádě a ke dnu za tvorby kalového kužele [3, 6].

Jemné chladové kaly vznikají až při ochlazování mladiny. Hlavní složkou jemných kalů jsou tříslobílkovinné komplexy. Jemné kaly se částečně odstraňují spolu s hrubými kaly, které je strhávají sebou. Separace může probíhat v sedimentačních kádích, odstředivkách, naplavovacích filtrech nebo flotačních tancích. Pro filtraci jemných kalů se používají naplavovací síťové nebo svíčkové filtry napojené na deskový chladič. Filtračním materiálem je křemelina nebo perlit. Při flotaci se ochlazená mladina přesycuje bublinkami vzduchu, které vynášejí částčky jemných kalů k hladině. Na hladině vzniká deka, přičemž mladina musí být odčerpána dříve, než se začnou kaly propadávat zpátky [3, 6].

Dochlazování mladiny probíhá v deskových chladičích, kde vyměňuje teplo mezi mladinou a chladicím médiem. Mladina teče v tenké vrstvě mezi deskami, z druhé strany proudí voda o teplotě 2 až 3 °C [3, 6].

Kyslík je důležitý pro množení kvasinek, průběh samotného kvašení i pro stupeň prokvašení. Provzdušňování se provádí pomocí Venturiho trubice, kde se sterilní vzduch přivádí do zúženého průřezu, ve kterém má průtok mladiny nejvyšší rychlost. Další možností je použití aeračních svíček z ocelových nebo keramických pórovitých materiálů. Mladina se provzdušňuje po výstupu z chladiče [3, 6].

#### **2.4.7. Kvašení**

Pro kvašení piva jsou používány kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které přeměňují cukry na alkohol a oxid uhličitý. Existují kvasinky spodního a svrchního kvašení, přičemž pro piva plzeňského typu se používají kvasinky spodního kvašení. Tyto kvasinky úplně zkvašují rafinosu a na konci kvašení sedimentují na dno, na rozdíl od kvasinek svrchního kvašení, které jsou vynášeny na hladinu. Při kvašení vzniká řada vedlejších produktů, které se podílejí na výsledném charakteru piva [3, 6].

Kvasinky využívají monosacharidy, disacharidy i trisacharidy rafinosu a maltotriosu. Jako první je odbourána glukosa a sacharóza, po poklesu jejich koncentrace se začíná zkvašovat maltosa. Jednoduché cukry jsou přeměněny na fruktosu-6-fosfát, který vstupuje do glykolýzy. Při glykolýze vzniká pyruvát, který se následně přemění na alkohol v anaerobních podmínkách. Za přístupu kyslíku kvasinky ethanol neprodukují, nýbrž se rozmnožují, kyslík v mladině je ale rychle vyčerpán [3, 6].

Při kvašení se snižuje obsah vysokomolekulárních látek, které vlivem snižujícího se pH vypadávají z roztoku. Adsorbují se na kvasinky nebo bubliny oxidu uhličitého a jsou unášeny k povrchu mladiny, kde tvoří deku, nebo sedimentují. Hořké chmelové látky se při poklesu pH vysrážejí, protože klesá jejich rozpustnost [3, 6].

Vedlejší produkty kvašení zahrnují vyšší alkoholy, aldehydy, volné mastné kyseliny, diketony a sloučeniny síry. Tvorba vedlejších produktů kvašení závisí na složení mladiny, teplotě, obsahu kyslíku a druhu použitých kvasinek. Vyšší alkoholy zahrnují především isoamylalkohol a isobutanol. Aldehydy se tvoří tím více, čím je vyšší obsah kvasinek a nižší provzdušnění mladiny. Z ketonů je nejdůležitější diacetyl, který má nepříznivé organoleptické vlastnosti. Organické kyseliny se tvoří v závislosti na použitých kvasinkách. Acidita mladiny vzrůstá díky tvorbě organických kyselin a spotřebě aminokyselin z původního pH mladiny 5,2 až 5,7 na 4,3 až 4,7. Kyselina octová a mravenčí vznikají odbouráním glukosy v množství 20 až 150 mg/l. Kyseliny pyrohroznová, jablečná, citronová a mléčná vznikají při látkové výměně v Krebsově cyklu. Nejvýznamnějšími vedlejšími produkty jsou však estery vznikající reakcí mastných kyselin a alkoholů. Jsou hlavními nositeli aroma a jejich obsah roste s intenzitou provzdušňování a vyšší teplotou. Ethylacetát dává pivu ovocnou vůni [3, 6].

Kvašení probíhá ve spilkách, chlazených a větraných prostorech s kvasnými káděmi. Ochlazená mladina je transportována do kvasných kádí, přičemž je během transportu prováděno provzdušňování sterilním vzduchem. Dále se při transportu provádí zakvašování kvasinkami, kdy se kvasnice přidávají přímo do potrubí. Po 12 až 24 hodinách po začátku kvašení se na hladině začíná objevovat pěna, které je ukazatelem stadia zaprašování a odrážení. Další etapou jsou nízké bílé kroužky. Během třetího až čtvrtého dne nastává stádium vysokých hnědých kroužků, kdy klesá pH a na hladinu jsou vynášeny mrtvé kvasinky a kaly. Posledním stupněm je propadání, při kterém se snižuje intenzita kvašení a výška pěny se snižuje. Na hladině zůstává nízká tmavá vrstva pěny – deky, která musí být odstraněna před jejím propadnutím, protože obsahuje látky způsobující nepříjemnou hořkost piva. Postupně dochází k sedimentaci kvasinek spodního kvašení na dno kádě, kde se po odčerpání mladého piva sbírají k dalšímu použití [3, 6, 14].

#### **2.4.8. Dokvašování**

Dokvašování mladého piva probíhá v ležáckém sklepě v ležáckých tancích nebo v CK tancích, které mohou být umístěny venku. Při zrání piva dochází k poklesu obsahu oxidu siřičitého, thiolů a mastných kyselin. Vznikají senzoryicky aktivní estery a nerozpustné komplexy bílkovin a polyfenolů. Pivo se sytí oxidem uhličitým při vyšším tlaku [3, 6].

Při dokvašování se pivo čirí, čímž je ovlivněna chuť piva. Zvyšuje se pěnivost piva a zlepšuje se jeho koloidní stabilita. V rámci číření dochází k mechanickému vylučování kalů a adsorpci. Kvasnice při tomto procesu sedimentují. Celková doba dokvašování se pohybuje od jednoho do deseti týdnů v závislosti na druhu piva [3, 6].

#### **2.4.9. Filtrace**

V průběhu filtrace se odstraňují zákalotvorné částice (bílkoviny, polyfenoly a jejich aglomeráty), kvasinky, bakterie a prekurzory zákalotvorných částic. Cílem je úprava piva ke stáčení tak, aby se neměnila jeho čírost [3, 6].

Kalové částice se mohou oddělovat pomocí sítového efektu, kdy jsou částice větší než póry filtrační přepážky, takže postupně tvoří vrstvu na povrchu filtračního materiálu. Dalším mechanismem je mechanické zachycování částic v pórech filtrační vrstvy. Částice se také mohou adsorbovat na vnitřní stěny pórů filtrační přepážky v důsledku rozdílného náboje [3, 6].

Filtrační přepážkou může být síto, plachetka, filtrační deska, porézní materiál nebo membrána. Filtrační přepážka slouží k zachycení filtračního materiálu. Jako filtrační materiál se nejčastěji používá křemelina nebo perlit. Křemelina je složena ze schránek rozsivek z oxidu křemičitého, průtočnost je úměrná její jemnosti. Vrstva křemeliny dokáže zachytit částice až do velikosti 0,1  $\mu\text{m}$ . Perlit je křemičitan hlinitý vulkanického původu, který nemá pórovitou strukturu, má větší průtočnost než křemelina, ale nižší filtrovací schopnost. Při nízkém pH se z perlitu uvolňuje železo a vápník [3, 6].

#### **2.4.10. Pasterace piva**

Cílem pasterace piva je zajištění jeho mikrobiologické stability. Pasterace představuje tepelnou inaktivaci mikroorganismů, jejichž metabolická aktivita by mohla pivo kazit. Biologická stabilita piva se pasterací zvýší z několika týdnů na řadu měsíců, chuťový profil piva však bývá narušen vznikem pasterizační příchuti. Původcem nežádoucí příchuti jsou karbonylové sloučeniny [3, 6].

Pivo se může pasterovat tunelovou pasterací, kdy lahve s pivem procházejí tunelovým pastérem nebo průtokovou pasterací mimo obal. Tunelová pasterace je nevhodná pro větší objemy, jelikož není dosaženo rovnoměrné teploty v celém objemu. Průtoková pasterace představuje zahřátí tenké vrstvy piva v deskovém výměníku na teplotu 68 až 70 °C po dobu 30–40 sekund [3, 6].

#### **2.4.11. Stáčení piva**

Konečnou fází výroby piva je jeho plnění do obalů. Při stáčení nesmí dojít ke ztrátám oxidu uhličitého a ke styku piva s kyslíkem. Pivo se proto stáčí do obalů pod tlakem oxidu uhličitého, dusíku nebo jejich směsi do obalů předplněných  $\text{CO}_2$ , dusíkem nebo směsí těchto plynů [9].

### **2.5. Chráněné zeměpisné označení České pivo**

V roce 1992 zavedla EU systém chráněných označení s cílem ochrany tradičních regionálních zemědělských a potravinářských produktů. Pivo s tímto označením je vyrobeno ze surovin určených SZPI, podle technologických postupů zaručujících dosažení senzorických vlastností českého piva. CHZO České pivo používají pivovary Bernard, Černá Hora, Plzeňský Prazdroj, Polička a další [12, 13].



*Obrázek 1 Logo Chráněné zeměpisné označení [5]*

## **2.6. Organické kyseliny**

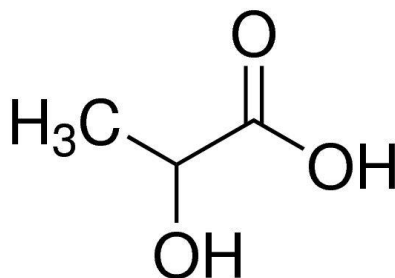
Organické kyseliny v potravinách pochází z metabolických procesů kvasinek a bakterií nebo jako látky přidané, např. stabilizátory kyselosti, konzervanty a antioxidanty. Snížením pH se podílejí na omezení rizika kontaminace nežádoucími mikroorganismy. Organické kyseliny přispívají k sensorickým vlastnostem potravin. Ostře kyslá chuť je přiřazována kyselině mléčné, sladkokyselou chutí se vyznačuje kyselina citronová, nahořklou až slanou chuť má kyselina jantarová. Kyselina šťavelová má nepříjemnou svíravou chuť. Kyselina citronová, malonová, askorbová a fosforečná jsou do potravin přidávány k redukci enzymatického hnědnutí [11, 18, 23].

V pive bylo detekováno více než sto různých druhů organických kyselin, včetně těkavých i netěkavých kyselin, aromatických kyselin a mastných kyselin. Celkové množství se pohybuje kolem 50–250 mg/l. Mezi nejdůležitější kyseliny, často stanovené v disociované formě, patří kyselina pyrohroznová, octová, mléčná, šťavelová, jablečná, citronová a  $\alpha$ -ketoglutarová. Tyto kyseliny jsou intermediáty nebo vedlejší produkty metabolismu pivovarských kvasinek. Jsou produkovány při kvašení spolu s ethanolem, oxidem uhličitým, glycerolem a dalšími meziprodukty [11, 18].

Tabulka 1 Typické koncentrace vybraných organických kyselin ve 12° ležáku [3]

kyselina [mg/l]	
octová	20-60
másečná	0,2-1
jantarová	50-150
šťavelová	10-20

### 2.6.1. Kyselina mléčná



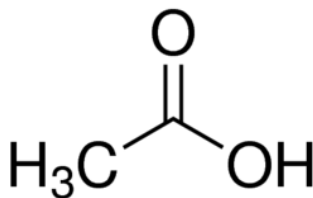
Obrázek 2 Vzorec kyseliny mléčné

Kyselina mléčná je hydroxykyselina s antiseptickými vlastnostmi. Použití kyseliny mléčné je jednou z metod sloužících k okyselení rmutů a sladín. Přídavek kyselého sladu, biologické okyselování nebo okyselování průmyslově vyráběnou kyselinou mléčnou podporuje řadu enzymatických reakcí probíhajících při nižším pH, intenzivnější štěpení vysokomolekulárních látek, rychlejší kvašení a zrání [6].

Při biologickému okyselování rmutů se používá kyselý rmut obsahující kyselinu mléčnou produkovanou bakteriemi mléčného kvašení. Kyselý rmut se vyrábí zvlášť ve fermentorech a po dosažení příslušné koncentrace kyseliny mléčné se přidává do sladiny ke snížení pH [6].

Kyselina mléčná vzniká v průběhu fermentace redukcí pyruvátu na L–laktát nebo D–laktát. Většina kvasinek během fermentace produkuje L–izomer. Koncentrace v ležácích se pohybuje kolem 135 mg/l [18, 29].

### 2.6.2. Kyselina octová

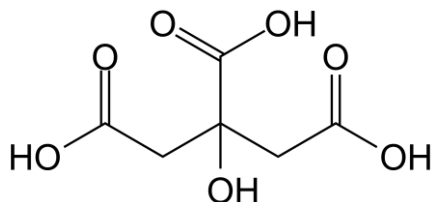


Obrázek 3 Vzorec kyseliny octové

Kyselina octová je jednosytná karboxylová kyselina, která patří mezi těkavé kyseliny. Její tvorba a obsah závisí na kmeni kvasinek a přítomnosti bakterií octového kvašení. Je vedlejším produktem kvašení a vzniká za anaerobních podmínek v množství asi 20–150 mg/l. Kyselina octová se akumuluje v mladině v lag-fázi a na počátku fermentace, kdy kvasinky přeměňují pyruvát na acetát, poté koncentrace klesá. Znovu se hromadí v mladině v pozdějších fázích

fermentace a také při konečném využití cukru. Vysoké koncentrace kyseliny mohou být příznakem mikrobiální kontaminace. Z kyseliny octové se tvoří estery, které dodávají pivu ovocnou chuť [6, 28, 29].

### 2.6.3. Kyselina citronová

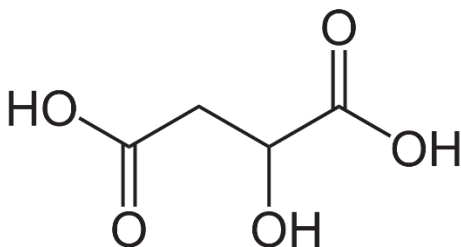


Obrázek 4 Vzorec kyseliny citronové

Kyselina citronová je slabou trikarboxylovou kyselinou. Jedná se o látku s konzervačním účinkem, která zvyšuje účinek antioxidantů, ale sama antioxidantem není. Používá se hlavně k ochucování nealkoholických nápojů a cukrovinek [17, 30].

Kyselina citronová je meziproduktem kvasničných metabolitů v Krebsově cyklu. Může být vytvářena při štěpení sacharidů a aminokyselin. Koncentrace kyseliny citronové ve spodně kvašených pivech se pohybuje kolem 88 mg/l [17, 30].

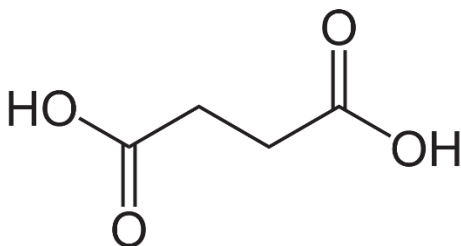
### 2.6.4. Kyselina jablečná



Obrázek 5 Vzorec kyseliny jablečné

Kyselina jablečná je dikarboxylová kyselina, která vzniká v Krebsově cyklu z pyruvátu karboxylací na oxalacetát a následnou redukcí na malát. Koncentrace této kyseliny v pivech se může pohybovat kolem 60–100 mg/l [18, 24, 32].

### 2.6.5. Kyselina jantarová

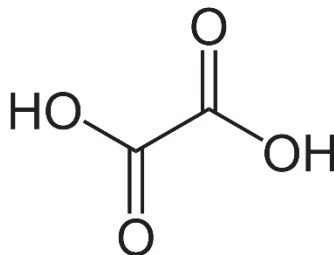


Obrázek 6 Vzorec kyseliny jantarové

Kyselina jantarová je nasycená dikarboxylová kyselina. Je součástí Krebsova cyklu, kde vzniká ze sukcinyl-CoA za tvorby GTP. Kyselina jantarová vzniká průběžně jako produkt metabolismu kvasinek na začátku kvašení. Koncentrace kyseliny jantarové se v pivech pohybuje okolo 42-116 mg/l [30, 31].



### 2.6.6. Kyselina šťavelová



Obrázek 7 Vzorec kyseliny šťavelové

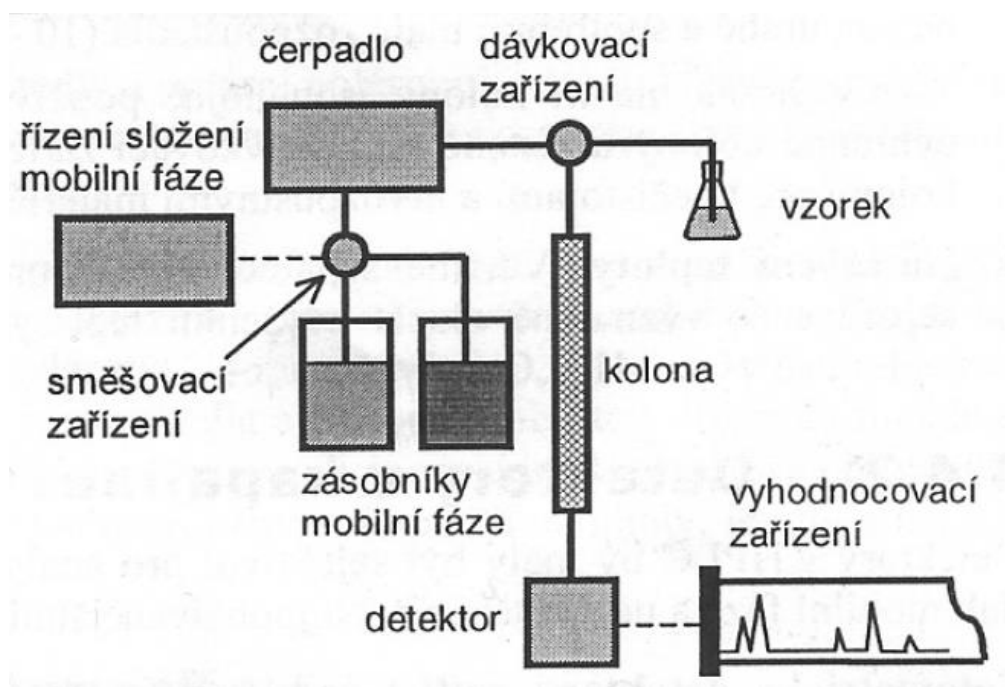
Kyselina šťavelová je obsažena v rostlinách, do piva se dostává ze sladu. Kyselina šťavelová má negativní účinky z hlediska výživy i technologie. Ve výživě je její výskyt nežádoucí, protože reaguje s vápníkem za tvorby solí, které způsobují ledvinové kameny. Ve formě šťavelanu způsobuje oxalátový zákal. Tato kyselina je jedním z faktorů způsobujících gushing (přepěňování) piva. V přítomnosti vápenatých iontů se tvoří šťavelan vápenatý, který napomáhá náhlému uvolňování oxidu uhličitého. Zdrojem vápníku je slad nebo křemelina. Obranou proti šťavelanovému gushingu může být použití tvrdší vody při výrobě nebo přídavek chloridu vápenatého, který vysráží šťavelan v prvních fázích výroby piva. Množství kyseliny šťavelové v pivu se pohybuje v rozmezí 5 až 30 mg/l [6, 23].

### 2.7. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je analytická metoda, která slouží k separaci, identifikaci a kvantifikaci analytu ve vzorku. Princip metody je založen na opakované tvorbě rovnováhy analytu mezi stacionární a mobilní fází při průtoku kolonou. Časem se jednotlivé látky unášené mobilní fází oddělí na základě jejich různých interakcí se stacionární fází. Stacionární fáze je umístěna v chromatografických kolonách, kterými protéká mobilní fáze, hnaná pomocí vysokotlakého čerpadla. Základními typy separačních mechanismů jsou adsorpce, rozdělování, výměna iontů, síťový efekt a afinita [11].

Nejčastěji využívané jsou chromatografické systémy s reverzními fázemi (RP-HPLC), kde je mobilní fáze polární, obvykle tvořená vodnou složkou. Stacionární fáze má nepolární charakter, kdy se nejčastěji jedná o navázané uhlíkaté řetězce na povrchu nosiče (nejběžněji oktadecyl C18) [11].

Základní instrumentace HPLC je znázorněna na obrázku č. 8. Mobilní fáze je pomocí vysokotlakého čerpadla přiváděna na kolonu. Mezi kolonou a čerpadlem je dávkovač vzorku, ze kterého je proudem mobilní fáze vzorek unášen na kolonu. Na výstupu z kolony je umístěn detektor, z něhož je signál veden do počítače [10].



Obrázek 8 Obecné schéma kapalinového chromatografu [21]

## 2.7.1. Součásti kapalinového chromatografu

### 2.7.1.1. Čerpadlo

Mobilní fáze se do kolony přivádí za pomoci pístového nebo membránového čerpadla. Čerpadla dosahují průtoku několika desítek mililitrů za minutu při tlaku až 60 MPa. Čerpadla se dělí na jednočinná, při jejichž použití vzniká tlakový ráz, a čerpadla dvojčinná, u kterých jsou tlakové pulsy omezeny. Jinou variantou vyhlazení pulsů je zapojení dvou čerpadel do série, kdy jedno čerpadlo mobilní fázi nasává a druhé ji vytlačuje [21, 22].

### 2.7.1.2. Odplynění

Plyn rozpuštěný v kapalině je pro HPLC nežádoucí, protože negativně ovlivňuje retenční čas, šum a stabilní průtok mobilní fáze. Navíc by vzduchové bublinky znemožňovaly funkci detektoru. Z těch to důvodů je nutné mobilní fázi i dávkované vzorky odplyňovat. K odplynění se používá buď vakuum, ultrazvuková lázeň nebo membránový odplyňovač, nicméně nejúčinnějším způsobem odplynění je probublávání mobilní fáze heliem [21].

### 2.7.1.3. Dávkovací zařízení

Nástřik vzorku do kolony probíhá za pomoci dávkovacího ventilu. Vzorek se dávkuje do smyčky otočením dávkovacího ventilu, kde je následně vytlačen mobilní fází do kolony [10].

### 2.7.1.4. Kolona

Na chromatografické koloně probíhá vlastní separace, analyt s mobilní fází přichází do kontaktu se stacionární fází. Kolony jsou vyrobené z nerezů nebo ze skla a jsou běžně naplněny částicemi sorbentu o průměru 3–10  $\mu\text{m}$ . Délka kolon se pohybuje od 10 do 25 cm. Kolony musí být odolné vůči vysokým tlakům a možnému korozivnímu působení mobilní fáze. Kolony se rozdělují podle polaritý náplně [20, 21].

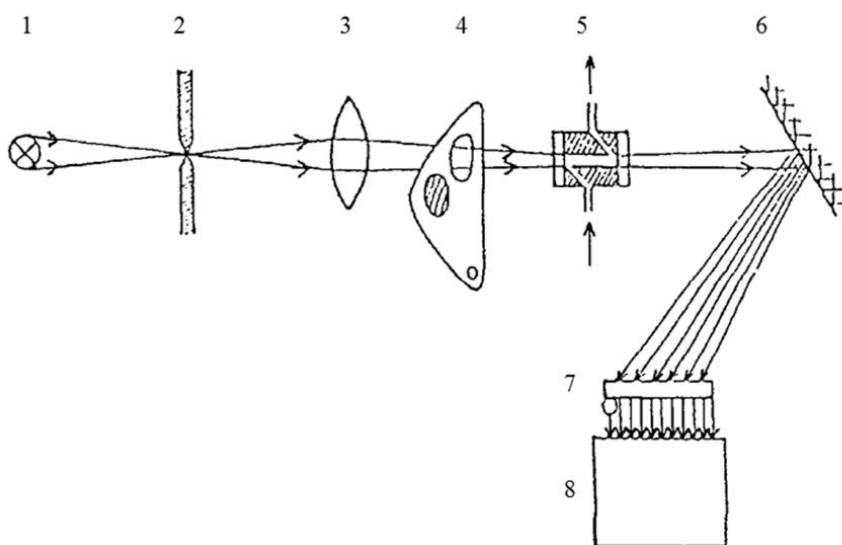
Mezi nejčastěji používané polární nosiče patří silikagel a oxid hlinitý. Silikagel obsahuje hydroxylové skupiny schopné vytvářet vodíkové můstky, a tím interagovat s analytem. Povrch oxidu hlinitého tvoří hydroxylové skupiny a elektronakceptorní centra, která interagují s molekulami bohatými na elektrony [20, 21].

Mezi nepolární nosiče se řadí např. aktivní uhlí, polyamidy a styrendivynylbenzenové kopolymery. Podle polaritý substituentu se mění polarita nosiče. Používanými nepolárními substituenty jsou např. alkylové (oktadecylové) a fenylové řetězce. Tímto způsobem lze získat často používaný silikagel s C18 skupinami, který tak nabyde nepolárního charakteru [20, 21].

#### 2.7.1.5. Detektor

Další součástí HPLC systému je detektor, který reaguje na změny složení eluátu vystupujícího z kolony. Umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu všech složek zkoumaného vzorku. Obecnými požadavky na detektor jsou univerzálnost, vysoká citlivost a nízká mez detekce [20–22].

Mezi nejběžnější detektory patří detektory fotometrické, které měří absorbanci eluátu z kolony. K dosažení co nejvyšší citlivosti je potřeba co nejdelší optická dráha kyvety. Jednodušší detektory měří signál při jedné vlnové délce, detektory s diodovým polem nebo CCD prvky snímají absorpční spektrum v určitém rozsahu vlnových délek. Detektor s diodovým polem je opatřen diodami napojenými na nabitě kondenzátory. Kondenzátory se při dopadu fotonu vybíjí. Měří se proud a čas potřebný k dobití kondenzátoru [20–22].



Obrázek 9 Schéma detektoru s diodovým polem [20]

1 – deuteriová lampa, 2 – štěrba, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – průtoková cela, 6 – holografická disperzní mřížka, 7 – souprava plošných fotodiod, 8 – PC

Refraktometrický detektor měří rozdíl mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze. Detektor je univerzální, není příliš citlivý a nelze jej použít pro gradientovou eluci [20–22].

Fluorescenční detektor snímá intenzitu fluorescenčního záření emitovaného excitovanými molekulami. Emitované záření se měří fotonásobičem kolmo k excitačnímu záření. Detektor se používá zejména pro sloučeniny obsahující aromatická jádra [20–22].

Amperometrický detektor měří proud protékající mezi dvěma elektrodami, na kterých probíhá reakce. Při použití tohoto detektoru musí být mobilní fáze vodivá [20–22].

Vodivostní detektor měří elektrickou vodivost eluátu mezi dvěma elektrodami. Na elektrody je vkládáno střídavé napětí, aby nedocházelo k jejich polarizaci. Mobilní fáze by měla být nevodivá [20–22].

#### **2.7.1.6. Počítač**

Poslední částí HPLC systému je počítač, který sbírá data a následně je zaznamenává formou chromatogramu. Staví detekční techniku proti retenčnímu času, a tím umožňuje identifikaci a kvantifikaci analytu. Přítomnost hledaného analytu musí být ověřena porovnáním se standardem o známé koncentraci [21].

#### **2.7.2. Iontová chromatografie**

Metoda iontové chromatografie využívá pevnou stacionární fázi s navázanými funkčními skupinami, které elektrostaticky interagují s ionty ve vzorku a mobilní fázi. Separace je založena na výměně iontů mezi mobilní a stacionární fází. Částice bez náboje procházejí kolonou nezadrženy, nabitě částice se zachytávají na iontoměniči [10].

Stacionární fáze (silikagel, celulóza, dextran aj.) má na svém povrchu ionizované funkční skupiny, např.  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_3^+$  nebo  $\text{NR}_3^+$ . Kationy obsahují sulfonovou nebo karboxylovou skupinu a využívají se pro analýzu kationtů. Aniony obsahují kvarterní amoniové báze nebo amoniové ionty. Na funkční skupiny je iontovou vazbou vázán protiiont s opačným nábojem, který je vyměňován s iontem v mobilní fázi. Nejpevněji se vážou nejobjemnější ionty s největší velikostí náboje [21].

Mobilní fáze je zředěný roztok kyseliny nebo zásady, popř. pufru. Eluční síla je určena iontovou silou, kdy s rostoucí iontovou silou roste síla eluční. Eluční síla je dále ovlivněna pH v závislosti na povaze stacionární fáze [10].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Seznam chemikálií

Tabulka 2 Použité standardy organických kyselin

Standard	M <sub>r</sub> (g/mol)	Čistota	Výrobce	Země původu	CAS
Kyselina citronová	192,123	≥99,5 %	Sigma-Aldrich	Rakousko	77-92-9
Kyselina jablečná	134,087	≥98 %	Sigma-Aldrich	Kanada	6915-15-7
Kyselina octová	60,052	1000±4 mg/l	Fluka	Švýcarsko	64-19-7
Kyselina mléčná	90,087	1001±6 mg/l	Fluka	Švýcarsko	50-21-5
Kyselina jantarová	118,09	min. 99,7 %	PENTA	Česká republika	110-15-6

Tabulka 3 Chemikálie pro HPLC

Název	M <sub>r</sub> (g/mol)	Čistota	Výrobce	Země původu	CAS
Kyselina fosforečná	97,994	≥85 %	Sigma-Aldrich	Švýcarsko	7664-38-2
Dihydrogenfosforečnan draselný	136,084	99,5–100,5 %	Sigma-Aldrich	Německo	7778-77-0
Acetonitril	41,053	min. 99,95 %	VWR International	Francie	75-05-8

#### 3.2. Seznam laboratorních pomůcek

- analytické váhy Ohaus Pioneer
- ultrazvuk – PS02000 ultrasonic compact cleaner 1,25L, PowerSonic (SR)
- předvážky
- běžné laboratorní sklo
- mikropipety
- pH metr Hanna Instruments HI 221
- mikrofiltry (PTFE, 25 mm, 0,45 µm, ČR)

#### 3.3. Přístroje

- kapalinový chromatograf Agilent Infinity 1260 (Agilent technologies, USA)
- kapalinový chromatograf 850 Professional IC

Tabulka 4 Parametry stanovení organických kyselin metodou HPLC

Objem nástřiku	1 µl
Průtok mobilní fáze	0,6 ml/min
Složení mobilní fáze	20 mM dihydrogenfosforečnan draselný
Teplota	30 °C
Kolona	Kinetex 2,6u Polar C18 150x4,6 mm
Detektor	UV-VIS
Detekce	210 nm

*Tabulka 5 Parametry pro stanovení organických kyselin metodou iontové chromatografie*

<b>Průtok MF</b>	0,6 ml/min
<b>Složení MF</b>	0,5 mmol HClO <sub>4</sub>
<b>Teplota</b>	30,0 °C
<b>Tlak</b>	5,39 MPa
<b>Typ kolony</b>	Metrosep Organic Acids - 250/7.8
<b>Detektor</b>	vodivostní
<b>Doba analýzy</b>	35 min

*Tabulka 6 Meze detekce organických kyselin*

<b>Kyselina</b>	<b>LOD (mg/l)</b>
mléčná	0,11
octová	0,08
citronová	0,12
jablečná	0,05
jantarová	0,11

### 3.4. Příprava kalibračních roztoků na IC

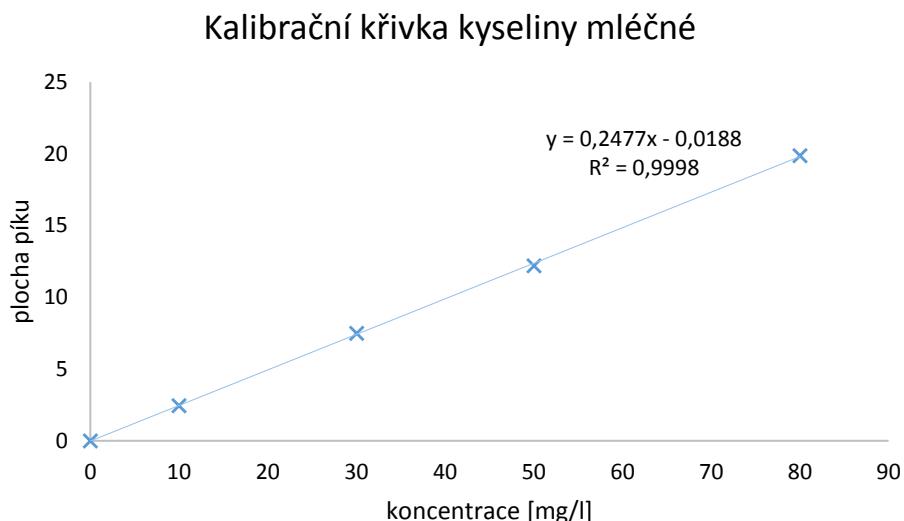
Pro tuto práci byly použity standardy pěti organických kyselin, jmenovitě citronové, octové, mléčné, jantarové a jablečné. Zásobní roztoky kyseliny mléčné, jablečné a citronové byly ředěny v příslušných poměrech demineralizovanou vodou. Navážka ostatních kyselin také odpovídala očekávané koncentraci v pivu (10–80 mg/l) [3].

### 3.5. Příprava kalibračních roztoků na HPLC

Standardy pro HPLC byly připraveny obdobně jako v případě iontové chromatografie, pro optimalizaci metody stanovení však byly použity vyšší koncentrace. Byly připraveny jak standardy směsné, tak pro každou kyselinu zvlášť v rozmezí 0,1–1 g/l. Standardní roztoky byly před samotnou analýzou přefiltrovány přes mikrofiltr.

### 3.6. Kalibrace při použití metody iontové chromatografie

Výsledné hodnoty proměřených standardů látek byly zpracovány do bodových grafů. Na obrázku níže je zobrazena ukázka kalibrační křivky pro kyselinu mléčnou.



*Graf 1 Závislost plochy píku na koncentraci*

### 3.7. Popis analyzovaných vzorků

Ke sledování obsahu organických kyselin v pivu bylo analyzováno celkem deset různých světlých piv zakoupených v obchodní síti. Všechny vzorky byly vyrobeny v České republice a nesly označení České pivo. Pro analýzu bylo vybráno pět piv typu ležák a pět výčepních piv. Přehled testovaných piv uvádí tabulka č. 7.

*Tabulka 7 Přehled analyzovaných piv*

Vzorek	Pivo	Výrobce	CHZO České pivo
1	Samson Světlý ležák 12°	Pivovar Samson a.s.	ano
2	Krušovice Dvanáctka	Heineken Česká republika, a.s.	ano
3	Radegast Ryze Hořká 12	Plzeňský Prazdroj, a.s.	ano
4	Gambrinus Plná 12	Plzeňský Prazdroj, a.s.	ano
5	Budweiser Budvar světlý ležák	Budějovický Budvar, n.p.	ano
6	Polička Hradební 10°	Měšťanský pivovar v Poličce a.s.	ano
7	Krušovice Desítka	Heineken Česká republika, a.s.	ano
8	Radegast Rázná 10	Plzeňský Prazdroj, a.s.	ano
9	Gambrinus Originál 10	Plzeňský Prazdroj, a.s.	ano
10	Argus 10	Pivovar Protivín a.s.	ano

### 3.8. Příprava vzorků

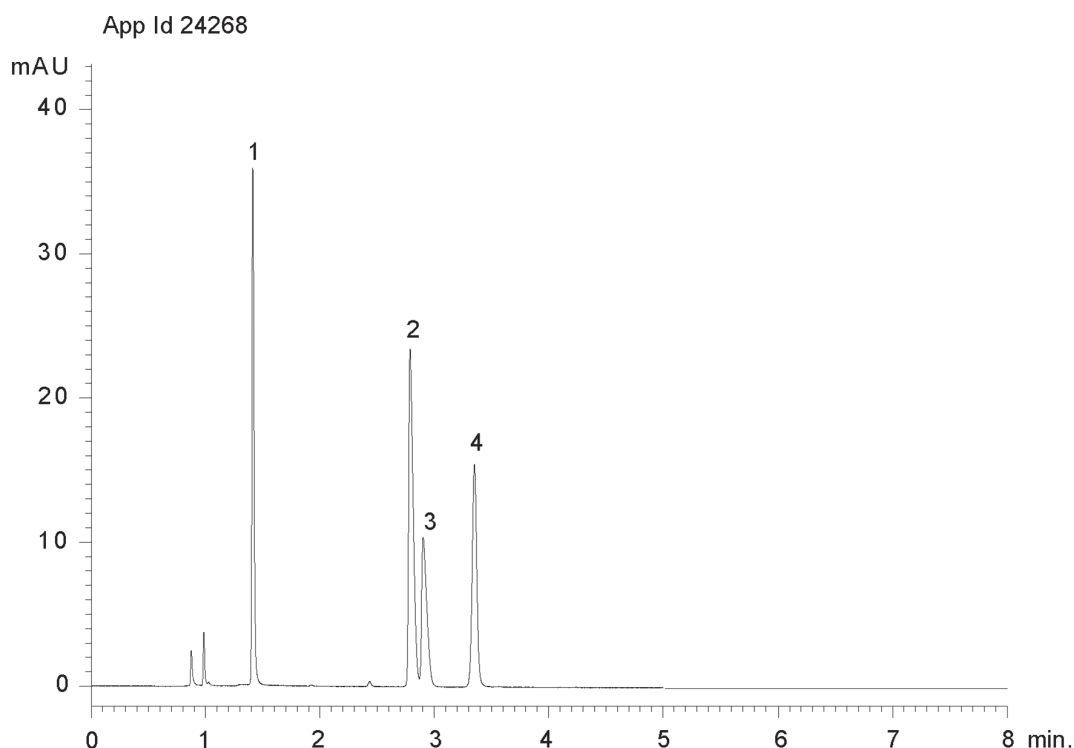
Vzorky byly nejdříve odplyněny ultrazvukem po dobu 25 minut. Následně byly zfiltrvány přes 0,45 µm mikrofiltry a zředěny přečištěnou vodou. Na analýzu pomocí iontové chromatografie bylo použito ředění 1:1, do zkumavek bylo pipetováno 5 ml vzorku a 5 ml destilované vody.

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem bakalářské práce byla optimalizace metody stanovení organických kyselin v pивě pomocí HPLC. Dále byl porovnán obsah organických kyselin mezi vzorky o různé stupňovitosti. Dosažené výsledky byly rovněž srovnány se zahraničními studiemi. Všechna analyzovaná piva nesla chráněné zeměpisné označení České pivo.

### 4.1. Optimalizace HPLC metody

K analýze organických kyselin v pivech byla vybrána vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Analýza byla inspirována aplikačním listem kolony Kinetex 2,6u Polar C18 150x4,6 mm, očekávaný výsledný chromatogram je zobrazen na obrázku 10.



Obrázek 10 Vzorový chromatogram z aplikačního listu vybrané kolony [33]  
1. kyselina jablečná, 2. kyselina citronová, 3. kyselina fumarová, 4. kyselina jantarová

Kolona obsahuje nepolární stacionární fázi, což znamená, že polární organické kyseliny budou zadržovány jen minimálně. Jako mobilní fáze byl zvolen 20 mM roztok dihydrogenfosforečnanu draselného o pH 1,5. K úpravě pH byla použita kyselina fosforečná. Tyto podmínky byly rovněž použity v aplikačním listu kolony.

Průtok mobilní fáze ve vzorové analýze byl 1,5 ml/min, tuto podmínku však nebylo z technických důvodů možné splnit. Tlak při tomto průtoku by byl až příliš vysoký. Byl zvolen průtok mobilní fáze 0,4 ml/min a 0,6 ml/min, tlak se v druhém případě pohyboval kolem 370 bar, tedy 37 MPa. Při vyšším průtoku došlo k posunutí všech píků o stejný retenční čas, analýza byla ukončena dříve, avšak na separovatelnost průtok mobilní fáze neměl vliv. Z tohoto důvodu lze očekávat, že rozdíl mezi průtokem v této práci a průtokem použitým při vzorové analýze pouze změní čas celkové analýzy.



Pro UV detekci byla vybrána vlnová délka 210 nm, jelikož se jedná o nejpoužívanější vlnovou délku pro sledování nederivatizovaných organických kyselin [32, 36].

Byl zvolen nástřik 1  $\mu$ l vzorku. Dále byl vyzkoušen nástřik 5  $\mu$ l a 10  $\mu$ l, avšak u 1  $\mu$ l bylo dosaženo nejužších píků a nejvyšší separační účinnosti.

I přes dodržení podmínek z aplikačního listu kolony byl výsledný chromatogram standardů organických kyselin neuspokojivý, viz obrázek 11. Z chromatogramu je vidět, že se většina kyselin vyeluovala už v mrtvém čase a nedošlo k interakci se stacionární fází. Píky kyseliny mléčné a citronové se překrývají, stejně tak jako píky kyseliny octové a jantarové. Obsah těchto kyselin v pivě však není zanedbatelný. Nejvíce uspokojivé separace dosahuje kyselina D-jablečná, která se však vyskytuje pouze ve standardu vyrobeném chemickou cestou z maleinanhydridu. Mikrobiálně získaná kyselina jablečná v pivě obsahuje pouze L-izomer [34].



Obrázek 11 Chromatogramy standardů organických kyselin o koncentraci 250 mg/l v různém přiblížení.

Organické kyseliny zleva: L-jablečná, citronová, mléčná, octová, jantarová, D-jablečná

Pro zlepšení separovatelnosti byly otestovány další mobilní fáze, a to sice:

- 5 mM dihydrogenfosforečnan draselný s 1 % acetonitrilu o pH 1,5
- 5 mM kyselina fosforečná s 1 % acetonitrilu o pH 1,5
- 10 mM kyselina fosforečná s 1 % acetonitrilu o pH 1,5
- 5 mM kyselina sírová s 1 % acetonitrilu o pH 1,5

Výsledky při použití těchto mobilních fází rovněž nebyly uspokojivé. Píky standardů sledovaných organických kyselin se vždy posunuly o stejný retenční čas a ke zlepšení separace nedošlo. Změny teploty od 30 °C do 60 °C neměly na separaci vliv.

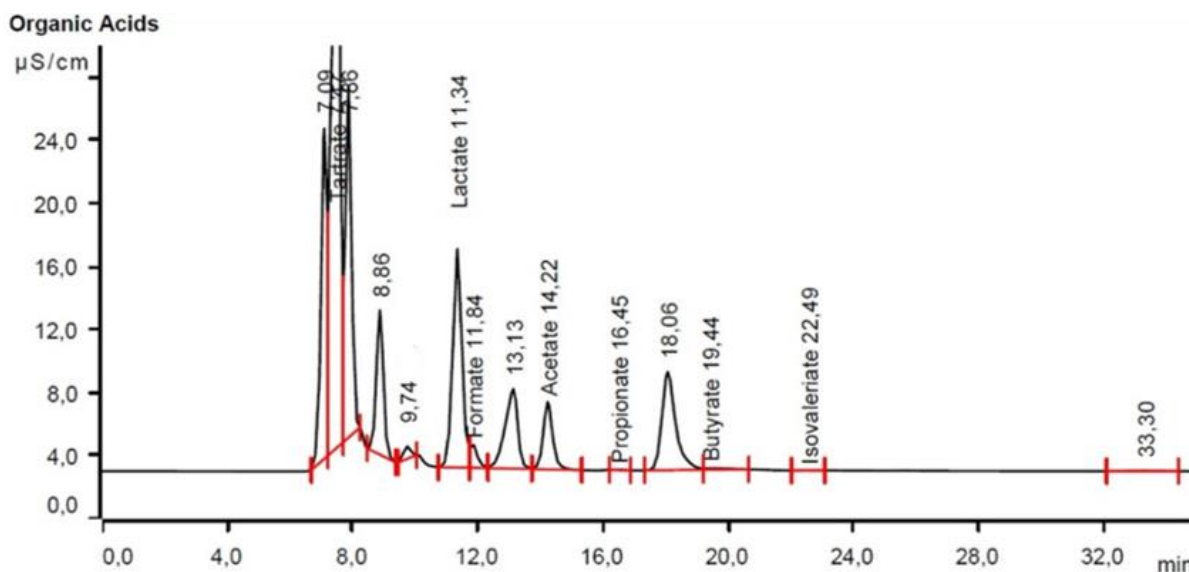
Kolona Kinetex 2,6u Polar C18 nepřinesla očekávané výsledky, proto byla vyzkoušena kolona Rezex Organic Acid 250 x 4.6 mm. Tato kolona funguje na principu iontové výměnné chromatografie popsané v odstavci 2.7.2. Kolona Rezex je delší oproti koloně Kinetex z předchozí analýzy, účinnost kolony a rozlišení by se tak měli zvýšit. Ačkoli je kolona přímo určena pro organické kyseliny, nepřinesla zásadní výsledky. Separace byla téměř totožná jako s původní kolonou Kinetex.

Poslední testovanou kolonou byla Synergi 4  $\mu$ m Hydro-RP 80 Å, 250 x 4.6 mm. Podle aplikačního listu této kolony, lze organické kyseliny bez problému separovat. Jako mobilní fáze byl použit 20 mM dihydrogenfosforečnan draselný, stejně tak jako v aplikačním listu. Tato kolona rovněž přinesla pouze posun všech píků o stejný retenční čas, separace byla nedostatečná.

Kvůli výše zmíněným nedostatkům metody byla pro analýzu organických kyselin v pívě zvolena iontová chromatografie s vodivostní detekcí.

#### 4.1.1. Stanovení organických kyselin metodou IC

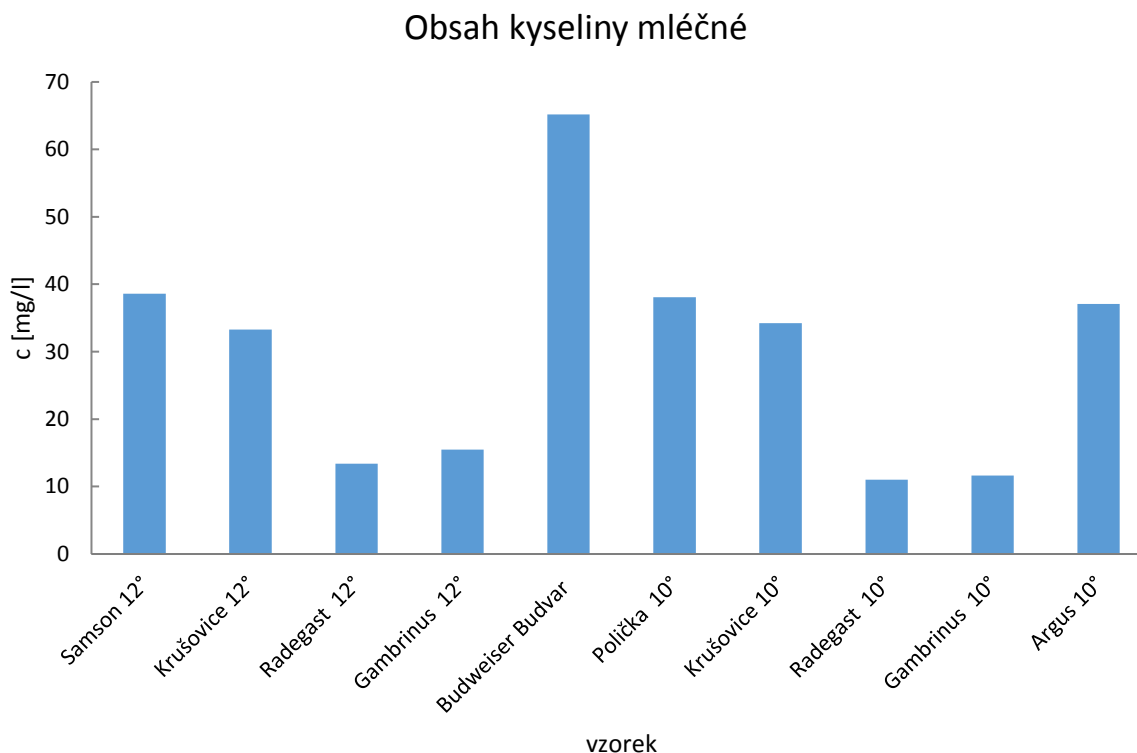
U všech vzorků byla sledována přítomnost vybraných organických kyselin metodou IC. Látky byly identifikovány podle jejich retenčních časů a výsledky měření byly následně vyhodnoceny ze získaných chromatogramů. Vybrané organické kyseliny se vyskytovaly ve všech vzorcích, přičemž technologicky nejvýznamnější kyseliny – kyselina octová a mléčná dosahovaly koncentrací 65–117 mg/l, respektive 11–65 mg/l.



Obrázek 12 Chromatogram vzorku č. 1 Samson Světlý ležák 12°

##### 4.1.1.1. Kyselina mléčná

Obsah kyseliny mléčné v analyzovaných vzorcích piva se pohyboval od 11,0 do 65,2 mg/l. Nejvyšší koncentrace byla stanovena ve vzorku Budweiser Budvar světlý ležák, nejnižší koncentrace byla v pívě Radegast Rázná 10. Jednotlivé koncentrace kyseliny ve vzorcích jsou uvedeny v grafu č. 2.



*Graf 2 Obsah kyseliny mléčné ve vzorcích pív*

Kyselina mléčná byla stanovena spolu s kyselinou jantarovou, protože obě kyseliny měly stejný retenční čas, jak při vyhodnocování standardních roztoků, tak i v reálných vzorcích. Naměřená koncentrace je proto zatížena chybou. Pro lepší separaci těchto dvou kyselin by bylo vhodné použít jiné složení mobilní fáze nebo jiné metody.

Naměřené koncentrace kyseliny mléčné korelují s koncentracemi uvedenými v literatuře. Výsledky analýzy českých pív jsou srovnatelné s výsledky analýz nizozemských pív plzeňského typu. Koncentrace kyseliny mléčné u nizozemských pív se pohybovala od 10 do 250 mg/l a byla stanovována enzymaticky [24]. Hodnota mediánu koncentrace kyseliny mléčné v nizozemských pivech byla 55,5 mg/l, medián koncentrací z této bakalářské práce byl 33,8 mg/l.

V ležácích v další studii, kde byla koncentrace stanovena v rozsahu 48–233 mg/l, jsou výsledky v některých případech až dvojnásobné v porovnání s výsledky dosaženými v bakalářské práci [29]. Hodnota mediánu koncentrací kyseliny mléčné v těchto zahraničních ležácích byla 139,0 mg/l.

Téměř dvojnásobných hodnot koncentrace kyseliny mléčné (66–186 mg/l) dosahovala italská piva typu ležák analyzované pomocí HPLC [31]. Podle této studie bylo výrobu těchto pív použito 30 % kukuřičné krupice, jakožto škrobnaté náhražky sladu. Je tedy patrné, že při použití surogátů při kvašení se výrazně ovlivňuje jeho průběh, a tím i vznik organických kyselin. Dále byla k výrobě těchto pív použita metoda high gravity brewing, založená na ředění mladiny s extraktem kolem 20–25 % vodou, která se ve vzorcích použitých v této bakalářské práci nepoužívala [6].

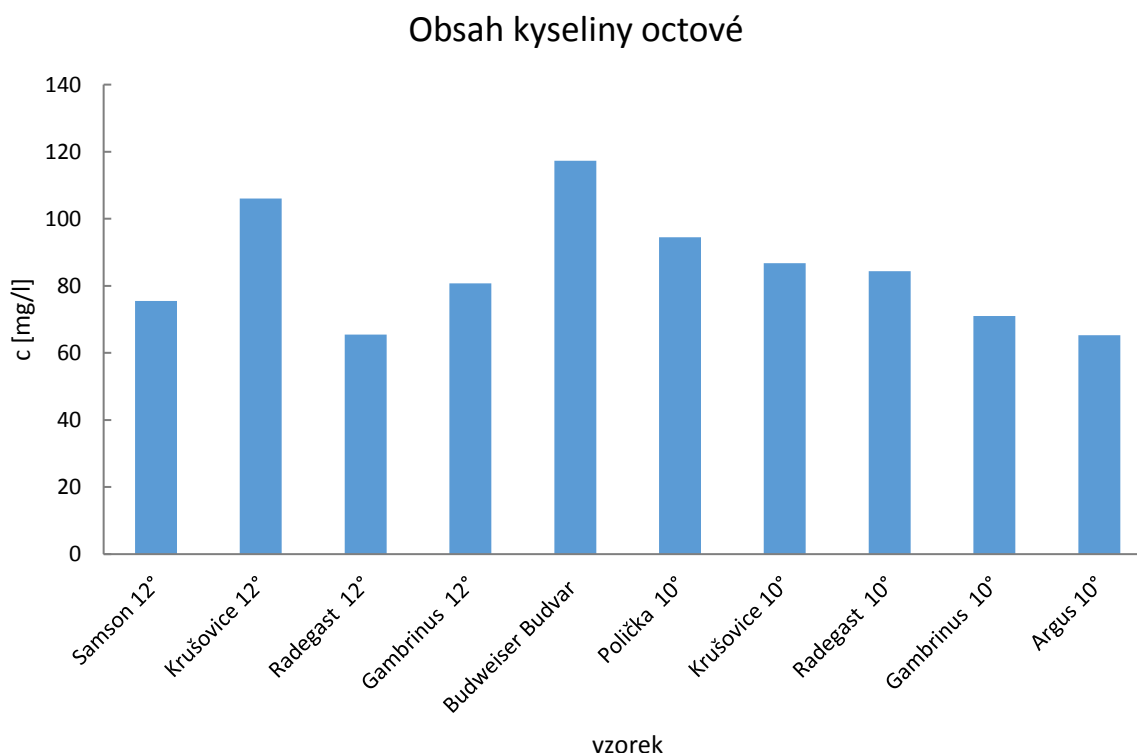
Rozdíl v koncentraci kyseliny mléčné může být zapříčiněn hned několika faktory. Obsah kyseliny mléčné závisí na použitém kmeni pivovarských kvasinek a na složení mladiny, např. absence thiaminu zvyšuje tvorbu kyseliny mléčné, díky reoxidaci NADH redukcí pyruvátu místo redukcí acetaldehydu na ethanol [18].

Dalším možným vysvětlením vyšší koncentrace kyseliny mléčné v zahraničních pivech je vyšší míra okyselování rmutu, ať už přidavkem průmyslově vyrobené kyseliny mléčné nebo biologickým okyselením přidavkem kyselého rmutu vyrobeného v pivovare. Okyselování rmutů se používá pro zvýšení acidity, která urychluje enzymatické reakce při rmutování, podporuje kvašení a zlepšuje pěnivost a trvanlivost piva.

Původ kyseliny mléčné u okyselování rmutů by bylo možné určit podle obsahu jednotlivých izomerů této kyseliny. Při průmyslové výrobě kyseliny mléčné se získává racemická směs, kdežto při kvašení vzniká čistý L–izomer. Jednou z vhodných metod pro stanovení jednotlivých izomerů je HPLC-MS [37, 38].

#### 4.1.1.2. Kyselina octová

Obsah kyseliny octové v analyzovaných vzorcích piva se pohyboval od 65,3 do 117,3 mg/l. Nejvyšší koncentrace byla stanovena ve vzorku Budweiser Budvar světlý ležák, nejnižší koncentrace byla v pivě Argus 10. Jednotlivé koncentrace kyseliny octové ve vzorcích jsou uvedeny v grafu č. 3.



Graf 3 Obsah kyseliny octové ve vzorcích piv

Coote et al. [29] uvádí koncentraci kyseliny octové v ležácích 22–107 mg/l, což odpovídá hodnotám zjištěných v této bakalářské práci. Koncentrace kyseliny octové v analyzovaných českých pivech jsou srovnatelné s italskými pivy, u kterých se udává koncentrace kyseliny octové od 28 do 159 mg/l [31]. V nizozemských pivech byla koncentrace stanovena v rozsahu 9–139 mg/l [24].

Basařová [3] uvádí obsah kyseliny octové v českých pivech 20–150 mg/l, což je v souladu s výsledky této bakalářské práce. Kosař et al. [6] však udává koncentraci kyseliny octové v českých pivech nižší, a to sice 20–60 mg/l.

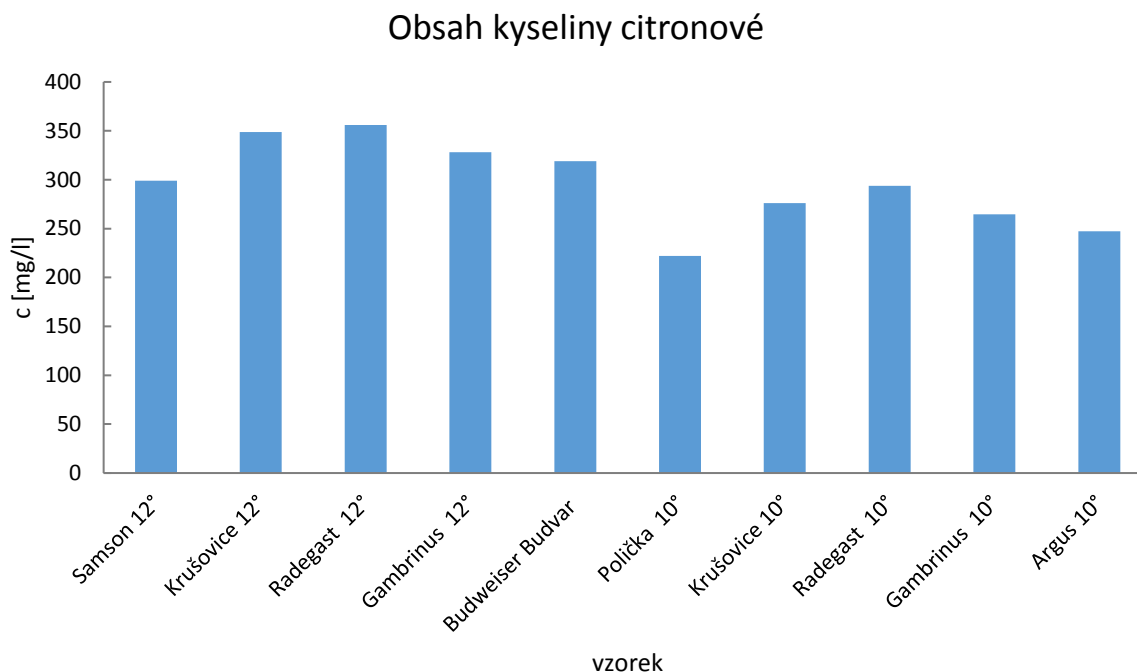
Dosažené výsledky byly porovnány se studií, která se zabývala stanovením organických kyselin v českých výčepních pivech rovněž metodou IC [35]. Obsah kyseliny octové se zde pohyboval v rozmezí 11–159 mg/l, průměrná hodnota byla 83,8 mg/l. Průměr jednotlivých koncentrací kyseliny octové naměřených v této bakalářské práci byl 84,7 mg/l.

Tvorba kyseliny octové je ovlivněna kmenem použitých kvasinek, složením média a podmínkami fermentace. I mírná změna ve složení aminokyselin, jakožto zdroje dusíku, výrazně ovlivňuje obsah kyseliny octové. Zvýšením počtu kvasinek a snížením množství kyslíku lze dosáhnout zvýšení množství kyseliny octové. Vyloučením biotinu, kyseliny panthotenové a thiaminu z média se zvýší obsah kyseliny octové. Proto se množství organických kyselin stanovených různými autory může lišit [18, 29].

Během celého procesu výroby piva může dojít k mikrobiologické kontaminaci. Kyselina octová tak může být produkována nejen octovými bakteriemi, ale i divokými kvasinkami, které se dostávají do meziproduktů výroby piva např. ze vzduchu [39].

#### **4.1.1.3. Kyselina citronová**

Obsah kyseliny citronové v analyzovaných vzorcích českých piv se pohyboval v rozmezí 221,9–355,8 mg/l. Nejvyšší koncentrace byla stanovena ve vzorku Radegast Ryze Hořká 12, nejnižší koncentrace byla ve vzorku Polička Hradební 10°. Jednotlivé koncentrace kyseliny citronové ve vzorcích jsou uvedeny v grafu č. 4.



*Graf 4 Obsah kyseliny citronové ve vzorcích pív*

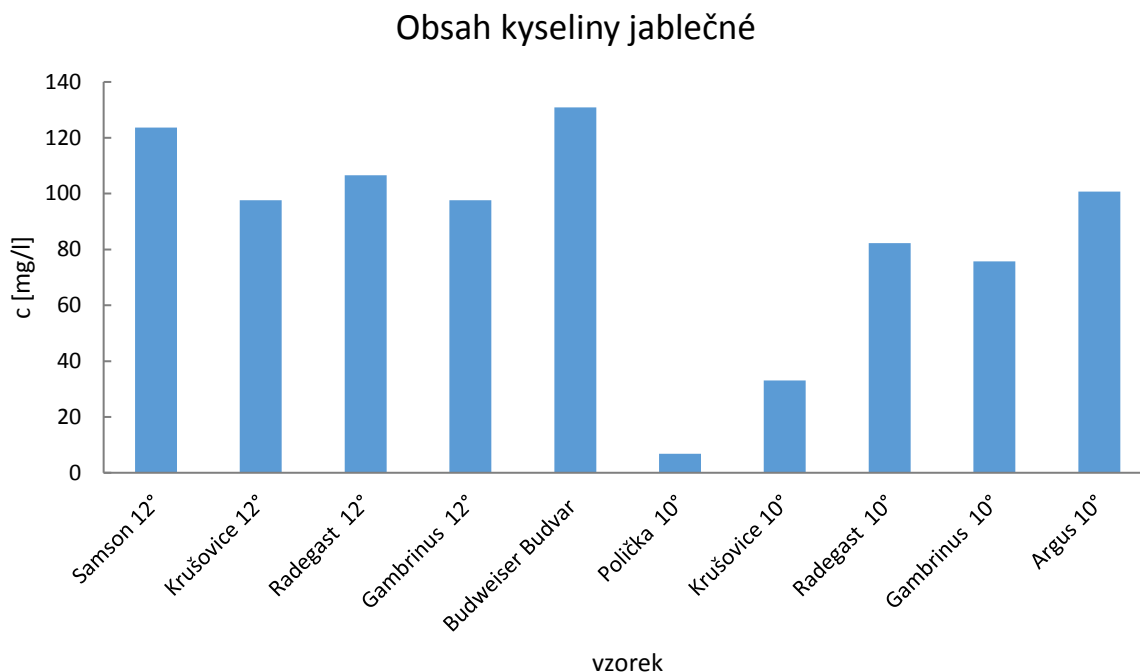
Z chromatogramu na obrázku 12 je patrné, že se kyselina citronová dostatečně neodseparovala od dalších látek obsažených v pivu. Nedostatečná separace vnáší chybu do integrace plochy píku a do vypočítané koncentrace. Obsah kyseliny citronové stanovený v této bakalářské práci byl tak mnohem vyšší, než uvádí literatura. Lepší separace by se mohlo docílit použitím jiné mobilní fáze nebo použitím jiné metody. Rozdíly mezi koncentracemi kyseliny citronové uváděnými v literatuře a naměřenými v bakalářské práci ukazuje následující tabulka.

*Tabulka 8 Koncentrace kyseliny citronové ve vybrané literatuře*

Zdroj	c (mg/l)	Poznámka
[29]	56–158	ležáky
[31]	99–131	italská piva s kukuřičnou náhražkou
[24]	131–186	nizozemské ležáky
[17]	88	spodně kvašené pivo plzeňského typu
	221–355	výsledky této práce

#### **4.1.1.4. Kyselina jablečná**

Obsah kyseliny jablečné se ve vzorcích pohyboval v rozmezí 6,8–130,9 mg/l. Nejvyšší koncentrace kyseliny jablečné byla stanovena ve vzorku Budweiser Budvar světlý ležák, nejnižší koncentrace byla ve vzorku Polička Hradební 10°. Jednotlivé koncentrace kyseliny ve stanovovaných vzorcích jsou uvedeny v následujícím grafu č. 5.

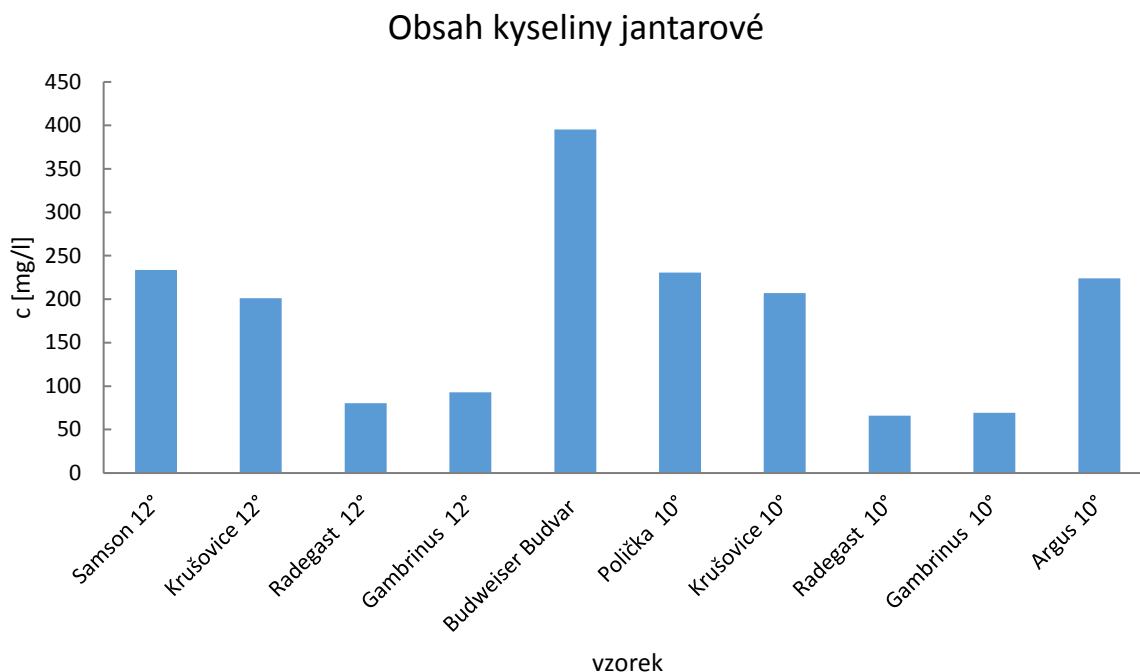


*Graf 5 Obsah kyseliny jablečné ve vzorcích pív*

Stanovené koncentrace kyseliny jablečné odpovídají koncentracím v nizozemských pivech (24–97 mg/l) i koncentracím v italských pivech s kukuřičnou náhražkou (40–93 mg/l) [24, 31]. Z těchto výsledků plyne, že obsah kyseliny jablečné není závislý na složení mladiny. Coote et al. [29] navíc uvádí, že obsah kyseliny nezávisí na kmeni použitých kvasinek.

#### **4.1.1.5. Kyselina jantarová**

Obsah kyseliny jantarové v analyzovaných vzorcích piva se pohyboval v širokém rozmezí 65,8–395,4 mg/l. Nejvyšší koncentrace kyseliny jantarové byla stanovena ve vzorku Budweiser Budvar světlý ležák, nejnižší koncentrace kyseliny byla ve vzorku Radegast Rázná 10. Jednotlivé koncentrace kyseliny jantarové ve vzorcích jsou uvedeny v grafu č. 6.



*Graf 6 Obsah kyseliny jantarové ve vzorcích pív*

Kyselina jantarová byla stanovována spolu s kyselinou mléčnou, jelikož se jejich píky nepodařilo odseparovat. Z literatury vyplývá, že obsah kyseliny jantarové je nižší než obsah kyseliny mléčné, nicméně v této bakalářské práci bylo dosaženo odlišných výsledků. Koncentrace kyseliny jantarové byla v této práci vyšší než koncentrace kyseliny mléčné.

V následující tabulce jsou shrnuty koncentrace kyseliny jantarové uvedené v literatuře a jsou porovnány s koncentracemi kyseliny jantarové naměřenými v rámci této bakalářské práce.

*Tabulka 9 Koncentrace kyseliny jantarové ve vybrané literatuře*

Zdroj	c (mg/l)	Poznámka
[29]	51–153	ležáky
[31]	43–116	italská piva s kukuřičnou náhražkou
[18]	36–166	
[17]	41	spodně kvašené pivo plzeňského typu
	65–395	výsledky této práce



#### **4.2. Porovnání koncentrací jednotlivých kyselin v pivech o různé stupňovitosti metodou ANOVA**

Pro srovnání koncentrace organických kyselin mezi pivy výčepními (o stupňovitosti přibližně 10°) a ležáky (o stupňovitosti přibližně 12°) byla použita statistická metoda ANOVA. U kyseliny octové, mléčné a jantarové byla hodnota  $F$  menší než  $F_{krit}$ , z čehož vyplývá, že na stupňovitosti piva, co se týče obsahu organických kyselin, nezáleží. U kyseliny citronové byla hodnota  $F$  větší než  $F_{krit}$ , ale z důvodu špatného odseparování píků nelze závěr, že koncentrace kyseliny závisí na stupňovitosti, považovat za platný.

U kyseliny jablečné byla hodnota  $F$  rovněž větší než  $F_{krit}$ . Můžeme tedy říci, že její obsah závisí na stupňovitosti piva. Všechna výčepní piva vykazovala nižší koncentraci než piva typu ležák, což je patrné i z grafu č. 5. Z toho plyne, že koncentrace kyseliny jablečné závisí na množství substrátu, tedy na koncentraci extraktu mladiny.

## 5. ZÁVĚR

V bakalářské práci byla diskutována výroba sladu a piva plzeňského typu. Hlavním cílem práce byla analýza vybraných organických kyselin ve výčepních pivech a ležácích s chráněným zeměpisným označením České pivo. Organické kyseliny vznikají zejména jako vedlejší produkty při kvašení a hrají důležitou roli při úpravě pH mladiny, přispívají k výsledné chuti piva a jsou přírodními konzervanty.

Měření pro experimentální část bylo rozděleno do dvou částí, a to sice, optimalizace metody stanovení organických kyselin pomocí HPLC s UV detekcí a stanovení organických kyselin metodou IC. Pro optimalizaci metody HPLC s UV detektorem bylo použito několik kolon a různých postupů, které však nevedly k dostatečné separaci všech složek. Pro stanovení organických kyselin v reálných vzorcích musela být použita iontová chromatografie s vodivostní detekcí.

Stanovené koncentrace jednotlivých kyselin byly porovnávány s údaji dostupnými v literatuře. Koncentrace jednotlivých kyselin v pivě udávané dostupnou literaturou se liší, protože je koncentrace kyselin většinou závislá na použitém kmeni kvasinek a složení mladiny. Kromě kyseliny citronové a jantarové byly naměřené koncentrace srovnatelné s dostupnou literaturou. U kyseliny citronové a jantarové nedošlo k úplné separaci od ostatních složek analytu, proto je jejich stanovená koncentrace zatížena chybou. Nejvyšší koncentrace organických kyselin byla stanovena ve vzorku Budweiser Budvar světlý ležák, nejnižších koncentrací dosahovaly značky Gambrinus a Radegast.

Pomocí statistické metody ANOVA byla zjišťována případná závislost obsahu organických kyselin na stupňovitosti piva. Tato závislost byla potvrzena pouze u kyseliny jablečné, kde se s nízkou stupňovitostí dosáhlo nízké koncentrace kyseliny jablečné.

## 6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Sladařství: teorie a praxe výroby sladu*. Praha: Havlíček Brain Team, 2015. ISBN 9788087109472.
- [2] KONEČNÝ, František Viktor. *Pivovarsko-sladařská pomocná příručka*. Praha, 1949.
- [3] KOSAŘ, Karel a Stanislav PROCHÁZKA. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000, 398 s. ISBN 80-902658-6-3.
- [4] Dvořáková, M., Guido, L. F., Dostálek, P., Skulilová, Z., Moreira, M. M., & Barros, A. A. (2008a). Antioxidant properties of free, soluble ester and insoluble-bound phenolic compounds in different barley varieties and corresponding malts. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(1), 27–33. doi:10.1002/j.2050-0416.2008.tb00302.x.
- [5] Budějovický Budvar již 12 let vyrábí pivo s logem Chráněné zeměpisné označení - Budějovický Budvar, n. p.. [online]. Copyright © 2016 Budějovický Budvar, n.p. [cit. 20.01.2018]. Dostupné z: <http://www.budejovickybudvar.cz/media/tiskove-zpravy/2016/chzo-12let.html>
- [6] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [7] GUIDO, Luis a Manuela MOREIRA. Malting. CORREIA, Paula Maria, ed. *Engineering Aspects of Cereal and Cereal-Based Products* [online]. CRC Press, 2013 [cit. 2017-12-21]. Contemporary Food Engineering. DOI: 10.1201/b15246-4. ISBN 978-1-4398-8702-8. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b15246-4>
- [8] Gibson, G. 2001. Malting. *Cereals Processing Technology*, edited by G. Owens. Cambridge, MA: Woodhead Publishing Limited, 2001. ISBN 185573561X.
- [9] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. Praha: VŠCHT, 2002, 236 s.: il. ISBN 80-7080-510-2.
- [10] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
- [11] NOLLET, Leo M. L. a Fidel. TOLDRÁ. *Food analysis by HPLC*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, c2013. ISBN 9781439830840.
- [12] CHZO České pivo @ České pivo. *O ČSPS @ České pivo* [online]. Copyright © 2017 Český svaz pivovarů a sladoven, [cit. 20.01.2018]. Dostupné z: <http://ceske-pivo.cz/cp/chzo-ceske-pivo>
- [13] Státní zemědělská a potravinářská inspekce | Kontrolní činnost SZPI. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce | Hlavní stránka* [online]. Copyright © Státní zemědělská a potravinářská inspekce 2018. [cit. 20.01.2018]. Dostupné z: <http://www.szpi.gov.cz/clanek/kontrolni-cinnostszpi.aspx?q=Y2hudW09OQ%3d%3d>

- [14] FERGUS G. PRIEST, Iain CAMPBELL. *Brewing Microbiology*. Third edition. Boston, MA: Springer US, 2003. ISBN 1441992502.
- [15] SOHRABVANDI, S., S. M. MOUSAVI, S. H. RAZAVI a A. M. MORTAZAVIAN. Application of Advanced Instrumental Techniques for Analysis of Physical and Physicochemical Properties of Beer: A Review. *International Journal of Food Properties* [online]. 2010, **13**(4), 744-759 [cit. 2018-03-29]. DOI: 10.1080/10942910902818145. ISSN 1094-2912. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942910902818145>
- [16] GUPTA, Mahesh, Nissreen ABU-GHANNAM a Eimear GALLAGHAR. Barley for Brewing: Characteristic Changes during Malting, Brewing and Applications of its By-Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2010, **9**(3), 318-328 [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2010.00112.x>
- [17] ENEBO, L., Gertrud BLOMGREN a Elisabeth JOHNSON. LOW MOLECULAR NON-VOLATILE ORGANIC ACIDS IN WORT AND BEER. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 1955, **61**(5), 408-411 [cit. 2018-05-01]. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1955.tb02815.x. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1955.tb02815.x>
- [18] WHITING, G. C. ORGANIC ACID METABOLISM OF YEASTS DURING FERMENTATION OF ALCOHOLIC BEVERAGES-A REVIEW. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 1976, **82**(2), 84-92 [cit. 2018-04-03]. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1976.tb03731.x. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1976.tb03731.x>
- [19] NEUBEARB. VON LUDWIG NARZISS. *Die Technologie der Würzebereitung*. 6. Aufl. Stuttgart: Enke, 1985. ISBN 3432850069.
- [20] PRAUS, Petr a Jiřina VONTOROVÁ. *Analytická chemie II*. Ostrava: VŠB – Technická univerzita Ostrava, 2015. ISBN 978-80-248-3734-5.
- [21] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 978-80-86369-07-5.
- [22] HOLZBECHER, Závěš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1987.
- [23] Havlová, P.; Šusta, J., Stanovení kyseliny šťavelové ve sladu a pivu. *Kvasný Průmysl*, 1997, **43** (2), 37-8.
- [24] KLOPPER, W. J., S. A. G. F. ANGELINO, B. TUNING a H. A. VERMEIRE. ORGANIC ACIDS AND GLYCEROL IN BEER. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 1986, **92**(3), 225-228 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1986.tb04405.x. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04405.x>

- [25] NYKÄNEN, Lalli. a Heikki. SUOMALAINEN. *Aroma of beer, wine, and distilled alcoholic beverages*. Hingham, MA: Distributors for the U.S.A. and Canada, Kluwer Boston, c1983. ISBN 902771553x.
- [26] Horák, T.; Čulík, J.; Jurková, M.; Čejka, P.; Kellner, V., Nové trendy v přípravě vzorků pro analýzu senzoricky aktivních látek v pivu. *Kvasný Průmysl*, 2002, 48 (7-8), 186-8.
- [27] Páca, J.; Unger, P.; Vozňáková, Z., Aplikace plynové chromatografie při analýze produktů buněčného metabolismu. *Kvasný Průmysl*, 1978, 24 (9), 208-11.
- [28] SIMPSON, Benjamin K., ed. *Food Biochemistry and Food Processing* [online]. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012 [cit. 2018-04-16]. ISBN 9781118308035.
- [29] COOTE, N. a B. H. KIRSOP. THE CONTENT OF SOME ORGANIC ACIDS IN BEER AND OTHER FERMENTED MEDIA. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 1974, **80**(5), 474-483 [cit. 2018-04-16]. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1974.tb06797.x. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.1974.tb06797.x>
- [30] Štefecná, K.; Čepička, J., Průběh změn hlavních organických kyselin v průběhu vinifikace. *Kvasný Průmysl*, 2001, 47 (9), 246-9.
- [31] MONTANARI, Luigi, Giuseppe PERRETTI, Fausta NATELLA, Alessia GUIDI a Paolo FANTOZZI. Organic and Phenolic Acids in Beer. *LWT – Food Science and Technology* [online]. 1999, 32(8), 535-539 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1006/fstl.1999.0593. ISSN 00236438. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364389905935>
- [32] PARK, Jong-Min, Jung-Ah SHIN, Jeung Hee LEE a Ki-Teak LEE. Development of a quantitative method for organic acid in wine and beer using high performance liquid chromatography. *Food Science and Biotechnology* [online]. 2017, 26(2), 349-355 [cit. 2018-04-18]. DOI: 10.1007/s10068-017-0047-9. ISSN 1226-7708. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10068-017-0047-9>
- [33] Phenomenex HPLC Application #24268: Organic Acids on Kinetex 2.6u Polar C18 150x4.6mm. Phenomenex UHPLC, HPLC, SPE, GC - Leader in Analytical Chemistry Solutions [online]. Dostupné z: <http://www.phenomenex.com/Application/Detail/24268>
- [34] ZELLE, R. M., E. DE HULSTER, W. A. VAN WINDEN, et al. Malic Acid Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Engineering of Pyruvate Carboxylation, Oxaloacetate Reduction, and Malate Export. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2008, 74(9), 2766-2777 [cit. 2018-05-03]. DOI: 10.1128/AEM.02591-07. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.02591-07>
- [35] VANDUCHOVÁ, P. *Analýza výčepního piva pomocí HPLC-ELSD a IC*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 60 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Pavel Diviš, Ph.D..

- [36] PÉREZ-RUIZ, Tomás, Carmen MARTÍNEZ-LOZANO, Virginia TOMÁS a Jesús MARTÍN. High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, 1026(1-2), 57-64 [cit. 2018-05-15]. DOI: 10.1016/j.chroma.2003.10.130. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967303020296>
- [37] Determination of L- and D-Lactic Acid Enantiomers by HPLC/MS/MS | Sigma-Aldrich. *Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services.* / Sigma-Aldrich [online]. Copyright © 2018 [cit. 15.05.2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/pharmaceutical/lactic-acid-enantiomers-hplc.html>
- [38] GHAFAR, Tayyba, Muhammad IRSHAD, Zahid ANWAR, et al. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* [online]. 2014, 7(2), 222-229 [cit. 2018-05-15]. DOI: 10.1016/j.jrras.2014.03.002. ISSN 16878507. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1687850714000314>
- [39] HOUGH, J. S., D. E. BRIGGS, R. STEVENS a T. W. YOUNG. *Microbiological Contamination in Breweries*. HOUGH, J. S., D. E. BRIGGS, R. STEVENS a T. W. YOUNG. *Malting and Brewing Science* [online]. Boston, MA: Springer US, 1982, 1982, s. 741-775 [cit. 2018-05-17]. DOI: 10.1007/978-1-4615-1799-3\_10. ISBN 978-1-4613-5727-8. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-1799-3\\_10](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-1799-3_10)

## **7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

EU	Evropská unie
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC	Iontová chromatografie
PTFE	Polytetrafluorethylen
CHZO	Chráněné zeměpisné označení
LOD	Limit detekce
ANOVA	Analýza rozptylu
GTP	Guanosintrifosfát
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
RP-HPLC	Reversed phase HPLC